



INSTITUTO POLITÉCNICO DE COIMBRA
ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA

Mestrado em Engenharia Alimentar

Relatório de Estágio Profissionalizante

**AVALIAÇÃO DO VALOR NUTRICIONAL E DE
PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DAS
MACROALGAS *Chaetomorpha linum*, *Ulva lactuca*,
Gracilaria vermiculophylla e *Fucus vesiculosus*.**

Joana Miguel Rodrigues

Orientador: Doutora Susana Maria de Almeida Cardoso

Co-orientador: Doutora Maria Manuel Balseiro Vidal

Local de estágio: Escola Superior Agrária de Coimbra

Coimbra, 2013

Este Relatório de Estágio Profissionalizante foi elaborado expressamente para a obtenção de grau de Mestre de acordo com o despacho nº 19151/2008 de 17/07/2008, referente ao Regulamento do Ciclo de Estudos conducente à obtenção do grau de Mestre do Instituto Politécnico de Coimbra.

AGRADECIMENTOS

Naturalmente que quero agradecer, sobretudo e em primeiro lugar, à minha orientadora de estágio, Susana Cardoso, que tal como ela sempre me pediu não coloquei o “doutora”. Por me ter aceite no estágio, sem qualquer tipo de experiência em laboratório, por me ajudar a aprender e a gostar de estar naquele trabalho, por me explicar tantos conceitos e conteúdos essenciais, por me encaminhar e exigir sempre alguma coisa a mais de mim, e sobretudo, por sempre, entre muito trabalho, ter uma palavra para mim. Assim como também, à minha co-orientadora, que sem ela não conseguiria o meu precioso material de trabalho.

Tenho também de agradecer às duas pessoas que contribuíram imenso para o meu desenvolvimento em laboratório, simplesmente por serem meus colegas e amigos, Marcelo Dias e Verónica Bouça, sem vocês ia ser sem dúvida tudo diferente. Assim como também, à Denise Andrade.

Ao Sr. José Carlos, por me dar sempre a mão no laboratório.

Por fim, à minha querida família que sempre tudo fez por mim em todos os momentos, e claro, ao meu namorado.

RESUMO

As algas marinhas possuem grande importância definida à muito tempo, mas somente a partir da 2ª Guerra Mundial é que se expandiu a sua real utilização. Hoje em dia as algas marinhas têm interesse na área alimentar, principalmente a nível dos seus polissacarídeos, pigmentos e ácidos gordos polinsaturados.

Assim, este trabalho teve como objetivo a pesquisa, recolha e análise do valor nutricional e de propriedades bioativas de algas marinhas da ria de Aveiro, de modo a reconhecer a sua importância.

As espécies em estudo foram a *Ulva lactuca* e a *Chaetomorpha linum* (algas verdes), a *Gracilaria vermiculophylla* (alga vermelha) e a *Fucus vesiculosus* (alga castanha). A análise nutricional das macroalgas foi efetuada de acordo com as recomendações AOAC (esquema de Weende), tendo ainda sido analisados alguns pigmentos, como as clorofilas (α e β), carotenóides e ficobiliproteínas, bem como os minerais. Por outro lado, a obtenção de extratos foi efetuada por extração sequencial, com *n*-hexano, metanol e água. Os extratos decorrentes de cada extração foram utilizados posteriormente no teste de Folin-Ciocalteu, teste DPPH• (radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) e teste do Poder Redutor, para avaliação do seu conteúdo total de compostos fenólicos e da atividade antioxidante.

Ao nível nutricional, as algas verdes em estudo apresentaram maiores percentagens de humidade e cinzas, enquanto a alga vermelha demonstrou ser mais rica em proteína bruta e mais pobre em gordura bruta. Por outro lado, a alga castanha possui maior percentagem de gordura bruta e menor quantidade de proteína bruta. Ainda nesta avaliação, quando determinados os metais pesados, observou-se maior expressão em todas as espécies, do ferro e magnésio.

Em relação à atividade antioxidante, os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que, das quatro algas, a *Fucus vesiculosus* é a mais promissora.

Palavras-Chave: algas, valor nutricional, antioxidantes, pigmentos, composição mineral.

ABSTRACT

Seaweeds have great importance to set a long time, but only since 2nd World War is expanded to its actual use. Nowadays marine algae have an interest in the food area, especially at the level of their polysaccharides, pigments and polyunsaturated fatty acids.

This study aimed to research, collection and analysis of nutritional and bioactive properties of seaweed from Ria de Aveiro, in order to recognize their importance.

The species studied were *Chaetomorpha linum* and *Ulva lactuca* (green algae), *Gracilaria vermiculophylla* (red algae) and *Fucus vesiculosus* (brown seaweed). The nutritional analysis of macroalgae was performed according to the AOAC recommendations, some pigments has been analyzed, such as chlorophylls (a and b), carotenoids and phycobiliproteins, as well as minerals.

On the other hand, obtaining the extracts was performed by sequential extraction with *n*-hexane, methanol and water. The resulting extracts from each extraction were later used in the Folin-Ciocalteu test, DPPH• test and Reducing Power test for evaluation of the total content of phenolic compounds and antioxidant activity.

In the nutritional level, the green algae in the study had higher percentages of moisture and ash, while the red alga proved richer in crude protein and poorer in crude fat. The results in brown alga have higher percentage of crude fat and lower of crude protein. When certain heavy metals we observed a higher expression in all species, with iron and magnesium.

Regarding the antioxidant activity, the results of this study indicate that of the four algae, *Fucus vesiculosus* is the most promising.

Keywords: seaweeds, nutritional value, antioxidants, pigments, mineral composition.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
ÍNDICE	v
ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES	vii
ÍNDICE DE TABELAS.....	viii
Lista de Abreviaturas	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Algas Verdes	2
1.2. Algas Vermelhas.....	4
1.3. Algas Castanhas	5
1.4. Potenciais aplicações das algas.....	6
• Ágar.....	9
• Carragenana	9
• Alginato.....	10
1.5. Valores Nutricionais	11
1.6. Antioxidantes	13
1.7. Objetivos	17
2. MATERIAIS e MÉTODOS.....	18
2.1. Preparação de amostras.....	18
2.2. Métodos de Avaliação Nutricional.....	19
2.3. Determinação do teor de humidade	19
2.4. Determinação do conteúdo em fibras.....	20
2.5. Determinação do conteúdo de metais	20
2.6. Determinação do teor de gordura	21
2.7. Determinação do conteúdo de proteína bruta	22
2.8. Determinação do teor de fibra bruta	23
2.9. Determinação do conteúdo em hidratos de carbono.....	24
2.10. Quantificação de Pigmentos	24
2.10.1. Quantificação de Clorofilas e Carotenóides.....	26

2.10.2. Quantificação de Ficobiliproteínas.....	26
2.11. Extração de Compostos Bioativos.....	27
2.12. Quantificação total de polifenóis – Teste Folin-Ciocalteu.....	29
2.13. Avaliação da capacidade antioxidante –	30
Método de captação de radicais livres (DPPH*)	30
2.14. Avaliação da capacidade antioxidante –	31
Método do Poder Redutor	31
3. RESULTADOS e DISCUSSÃO	33
3.1. Avaliação Nutricional.....	33
▪ Metais Pesados e Macronutrientes.....	36
3.2. Pigmentos	39
▪ Algas Verdes.....	39
▪ Algas Vermelhas	40
▪ Algas Castanhas.....	42
3.3. Extrações de compostos bioativos.....	43
3.4. Avaliação da quantidade de Compostos Fenólicos	44
3.5. Avaliação da capacidade antioxidante –	46
Método de captação de radicais livres (DPPH*)	46
3.6. Avaliação da capacidade antioxidante – Método do Poder Redutor	49
4. CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1 - <i>Chaetomorpha linum</i>	3
Ilustração 2 - <i>Ulva lactuca</i>	3
Ilustração 3 - <i>Gracilaria vermiculophylla</i>	5
Ilustração 4 - <i>Fucus vesiculosus</i>	6
Ilustração 5 - Localização da aquarícia, local onde foram colhidas as algas em estudo.	18
Ilustração 6 – Cadinhos com amostras depois de determinadas as cinzas.	20
Ilustração 7 - Cadinhos com amostras em digestão ácida.....	21
Ilustração 8 - Extração com éter no aparelho Soxhlet.	22
Ilustração 9 - Tubos digestores antes da etapa da digestão.	23
Ilustração 10 – Digestão básica e respectivos cadinhos de filtro.	24
Ilustração 11 - Alga <i>Gracilaria vermiculophylla</i> depois de trituração.....	27
Ilustração 12 - Composição nutricional das algas <i>Chaetomorpha linum</i> , <i>Ulva lactuca</i> , <i>Gracilaria vermiculophylla</i> e <i>Fucus vesiculosus</i>	34
Ilustração 13 - Gráfico dos compostos quantificados nas algas verdes, em mg/g alga seca (média \pm DP, n=3).	40
Ilustração 14 - Gráfico dos compostos quantificados nas algas vermelhas, em mg/g alga seca (média \pm DP, n=3).	41
Ilustração 15 - Gráfico dos compostos quantificados nas algas castanhas, em mg/g alga seca (média \pm DP, n=3).	42
Ilustração 16 - Gráfico representativo dos rendimentos de extração obtidos com os diferentes solventes.	43
Ilustração 17 - Quantidade total de compostos fenólicos, em μ g EAG/mg, nos diferentes extratos..	45
Ilustração 18 – Atividade antioxidante quantificada nos vários extratos pelo método DPPH*, em % de inibição versus concentração do extrato no meio de reação.	47
Ilustração 19 - Atividade antioxidante quantificada nos vários extratos, da <i>Fucus vesiculosus</i> , pelo método do Poder Redutor, em absorvância (nm) versus concentração meio reação (mg/mL) (n=2).....	49

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Aplicações dos Ficocolóides das macroalgas.	7
Tabela 2 - Propriedades nutricionais das algas marinhas.....	12
Tabela 3 - Valores de humidade e energia total das 4 algas.	33
Tabela 4 - Representação dos valores obtidos na determinação dos metais pesados, em mg/kg.....	37
Tabela 5 - Representação dos valores obtidos na determinação dos macronutrientes, em g/100g amostra seca.	39
Tabela 6 - Tabela resumo com o IC ₅₀ para a capacidade de redução do DPPH* dos diferentes extratos na <i>Fucus vesiculosus</i> e do ácido ascórbico.	49
Tabela 7 - Valores do IC ₅₀ para a capacidade de redução da forma férrica à forma ferrosa dos diferentes extratos da <i>Fucus vesiculosus</i> e do BHA.	50

Lista de Abreviaturas

BHA: butil hidroxianisol

BHT: butil hidroxitolueno

GP: galato de propila

TBHQ: terc-butil hidroquinona

DMSO: dimetilsulfóxido

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

Ext *n*-Hex: extrato de *n*-hexano

Ext MeOH: extrato metanólico

Ext snEtOH: extrato do sobrenadante etanólico

Ext ppEtOH: extrato do precipitado etanólico

Ext H₂O: extrato do sobrenadante aquoso

1. INTRODUÇÃO

As algas constituem uma multiplicidade de espécies que vão desde organismos unicelulares microscópicos a grandes conjuntos de algas. São seres fotossintetizantes, contudo não possuem folhas, raízes ou tecidos vasculares. Estas habitam oceanos, solos, rochas e até árvores. Representam uma parte significativa da biodiversidade global, constituindo um grande e diversificado grupo de organismos que desempenham um papel ecológico e vital em comunidades marinhas (Wijesinghe & Jeon, 2011).

Existem mais de 5000 espécies de algas, com estruturas, arranjos celulares e pigmentos fotossintéticos diferentes, variando significativamente de espécie para espécie (Sze, 1998).

No entanto, em todo o mundo apenas cerca de 221 espécies de algas são usadas para diversos fins (125 espécies de algas vermelhas, 64 espécies de algas castanhas e 32 espécies de algas verdes) (Pereira, 2011). Deste universo de algas utilizadas, cerca de 145 espécies são consumidas diretamente como alimento e 101 espécies através da indústria dos ficocolóides. Outras atividades usam algumas espécies na medicina tradicional, na agricultura, em rações e fertilizantes e, ainda, cerca de 12 espécies são cultivadas em “agricultura marítima” (Pereira, 2011).

Dada a sua abundância nos ecossistemas marinhos e ao fato destas serem um recurso marinho potencialmente renovável, estes organismos podem representar uma importante fonte de novos compostos bioativos com excelentes capacidades, que poderão ser importantes para o desenvolvimento de novas moléculas com interesse, quer para a indústria alimentar quer para a indústria farmacêutica, entre outras (Matsukawa *et al.*, 1997).

As algas agrupam-se muitas vezes com base na sua coloração, estando divididas em três filos principais: algas castanhas, vermelhas e verdes. Em geral, os botânicos referem-se aos três grupos como *Phaeophyceae*, *Rhodophyceae* e *Chlorophyceae*, respectivamente (Van den Hoek, 1995).

No geral, as algas castanhas são grandes, variando desde 30-60 cm até os 20 metros de comprimento (os chamados *kelps*). Por outro lado, as algas

vermelhas variam de poucos centímetros até cerca de 1 metro de comprimento. Esta última gama de variações de tamanho é também observada nas algas verdes (McHugh, 2003).

O uso de algas tem fortes raízes em alguns países da Ásia, como a China, Japão e antiga República da Coreia, mas a sua procura tem vindo a aumentar na América do Norte e do Sul, bem como na Europa. Constituem portanto um produto bastante versátil, como já referido, utilizado no consumo alimentar humano, na indústria dos cosméticos, no fabrico de aditivos animais e como fertilizante (Vazhiyil Venugopal, 2011). Atualmente são usadas, por exemplo, em rações de cães ou gatos, desempenhando um papel importante na saúde e nutrição animal, pois além de serem nutritivas são organismos vegetais de crescimento rápido na natureza.

1.1. Algas Verdes

As algas verdes pertencem a uma linhagem de células eucarióticas, caracterizada pela presença de cloroplastos, tilacóides empilhados (ou seja, bolsas discoidais e achatadas derivadas das membranas internas e externas dos cloroplastos) e clorofilas α e β . O seu polissacarídeo de reserva, presente no interior dos cromoplastos (orgânulos citoplasmáticos que apresentam pigmentos no seu interior) é o amido (Friedl, 1997).

A sua localização ocorre tanto em praias arenosas como rochosas, podem tolerar baixa salinidade e colonizar áreas onde os rios encontram o mar. A cor verde da alga deve-se à clorofila, pigmento verde necessário para a fotossíntese da luz. Desta forma, estas algas necessitam de bons níveis de luz e, portanto, não prosperam em áreas com profundidade ou sem luz (PZNOW, SD).

As algas verdes são consideradas pelos botânicos, em geral, as mais semelhantes às plantas, sendo responsáveis por uma boa qualidade da água quando presentes em concentrações consideráveis, absorvendo, por exemplo, os herbicidas em decomposição (Gow, SD).

Estruturalmente, as algas verdes são particularmente simples. Em particular, a *Chaetomorpha linum* é uma alga filamentosa não ramificada com células numa única linha (semelhante a fios de esparguete), enquanto a *Ulva lactuca* apresenta folhas finas, apenas com uma ou duas camadas de células de espessura, mas que pode ter taxas de crescimento até 30% por dia. Estudos mostraram que as duas algas têm taxas de crescimento elevadas. O seu elevado teor em hidratos de carbono permite-lhes utilizações em fermentações (PZNOW, SD).

Na indústria farmacêutica estas algas têm sido aproveitadas como vermícidas (em fármacos para expelir vermes do trato gastrointestinal) ou no tratamento da gota (Pereira, 2010).



Ilustração 1 - *Chaetomorpha linum* (imagens da base de dados MACOI e algaeBASE).



Ilustração 2 - *Ulva lactuca* (imagens da base de dados MACOI).

1.2. Algas Vermelhas

As algas vermelhas podem variar na coloração, entre o castanho a cinzento-escuro, dependendo da disponibilidade da luz solar, sendo sobretudo características de águas com um pH inferior a 5 (Robert E. Lee, 2008).

Podem ser encontradas em zonas de poucas correntes e com fluxos de médio porte (lagoas, estuários ou portos), ocorrendo em todas as latitudes, percorrendo as costas leste e oeste do oceano Atlântico, bem como o mar Báltico, sendo a sua temperatura de crescimento ótima entre os 15-25°C (Guiry & Guiry, 2012).

Estas algas adaptam-se a grandes profundidades, até cerca de 200 metros, capacidade que está relacionada com a função dos seus pigmentos acessórios aquando da realização da fotossíntese (Robert E. Lee, 2008). Estes pigmentos são as ficobiliproteínas (ficocianinas, ficoeritrinas e aloficocianinas), estando presentes em quantidades que podem chegar até 5% do total de matéria seca da alga. Destas, as ficoeritrinas possuem a função de melhorar a absorção de luz no espectro visível, auxiliando a realização da fotossíntese quando estas algas se encontram a maiores profundidades (Rabinowitch & Govindjee, 1969).

Estruturalmente, a alga *Gracilaria vermiculophylla* (alga em foco neste estudo) é ramificada, formando arbustos de reduzidas dimensões que podem ir até aos 60 cm. Para além da sua importância económica decorrente do seu elevado teor de ágar, esta alga ainda serve de alimento tanto a humanos, como a várias espécies de moluscos, sendo também um excelente substrato na produção de biometano (Biowalk4Biofuel, SD).

As algas vermelhas são também usadas na indústria farmacêutica como anti-helmínticos ou vermícidias, anticoagulantes e no tratamento de gastrites e diarreias (Pereira, 2010).

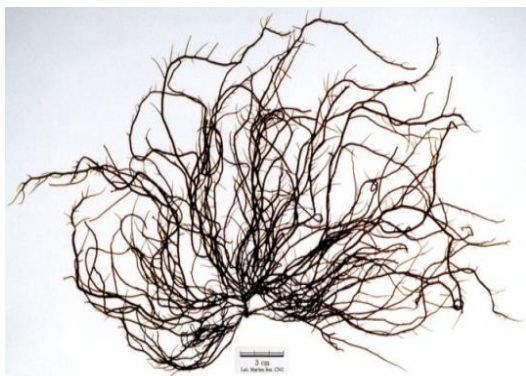


Ilustração 3 - *Gracilaria vermiculophylla*.

(fonte: Phyto Key— Rhodophyceae— Macroscopic Reds— Gracilaria
<http://cfb.unh.edu/phycokey/phycokey.htm>)

1.3. Algas Castanhas

As algas castanhas são edíveis, podendo ser usadas como alimento, no entanto, o seu grande potencial deriva dos seus extratos, úteis, por exemplo, para tratamentos anti-inflamatórios e na perda de peso.

Estas algas são estruturalmente constituídas por celulose e polissacarídeos estruturais (por exemplo os ácidos algínicos) e as suas reservas de alimento constituídos por polímeros de hidratos de carbono (moléculas de laminarina ou laminarano) (Rank, SD).

A *Fucus spp.* contém polissacarídeos, polifenóis, oligoelementos e minerais, potássio, bromo, cloro, magnésio, cálcio, ferro e silicone, manitol, vitaminas e pró-vitaminas A e D, ácido ascórbico e lípidos (Pereira, 2011). Devido a todas estas características, estas algas são utilizadas no tratamento de processos reumáticos, arteriosclerose, transtornos menstruais, hipertensão, úlceras gástricas, bócio, doenças da pele, sífilis e efeito anticoagulante (Pereira, 2010).

Em particular, a *Fucus vesiculosus*, comum em costas rochosas de regiões frias a temperadas, possui uma morfologia variável consoante as condições do ambiente (se o seu crescimento ocorre em áreas sujeitas a forte ação das ondas esta não desenvolve o crescimento de vesículas de gás

(pneumatocistos), ao passo que aquelas que crescem em zonas calmas ocorre a formação destas vesículas) (Robert E. Lee, 2008).



Ilustração 4 - *Fucus vesiculosos* (imagem da base de dados MACOI e algaeBASE).

1.4. Potenciais aplicações das algas

Atualmente as algas são utilizadas com diversos fins, podendo ser consumidas diretamente, usadas como fonte de extração de ficocolóides ou componentes bioativos e ainda como biofertilizantes (Pereira, 2010).

As algas usadas na alimentação em países Asiáticos como o Japão ou a China são por exemplo: *Porphyra spp.*, denominada de *nori*; da *Ulva spp.*, designada de *nori* verde (onde se insere a espécie *Ulva lactuca*); a *Laminaria japonica*, de onde surgiu o chamado *kombu* e a *Undaria pinnatifida*, de onde se obtém o *wakame*. Na Europa, em particular na Irlanda, a alga vermelha chamada *dulse* (*Palmaria palmata*) é muito comum, enquanto em França e Inglaterra se encontra a alga castanha denominada de esparguete do mar (*Himanthalia elongata*) e até nos Açores, em algumas receitas tradicionais, como a omeleta de erva patinha, são utilizadas algas dos géneros *Ulva* e *Porphyra* (Pereira, 2010). Ainda, as algas são muito utilizadas na alimentação animal, em suplementos alimentares. Exemplos disso são as algas *Ascophyllum nodosum* (alga porco), *Alaria esculenta* (alga vaca) e *Palmaria palmata* (alga cavalo ou vaca).

Quanto à indústria de ficocolóides, esta representa um mercado crescente que movimenta anualmente milhões de euros no mundo. O interesse económico pelos ficocolóides explica-se pelo fato de apresentarem propriedades gelificantes e espessantes, o que lhes agrega considerável valor comercial. São substâncias mucilaginosas extraídas de algas, compostas por polissacarídeos coloidais que, quando em meio aquoso, formam substâncias viscosas, incluindo géis, que podem solidificar com o decréscimo da temperatura. São classificados em alginatos, ágar e carragenanas. O uso destas substâncias nos mais variados tipos de indústrias vem crescendo à medida que novas e diferentes propriedades destes são desenvolvidas. Assim, são utilizados na indústria alimentar, farmacêutica, cosmética, papel, têxtil, petrolífera e na biotecnologia (Lein de Leon, SD). A tabela seguinte resume algumas das principais aplicações dos hidrocolóides.

Estes três hidrocolóides são hidratos de carbono solúveis em água usados para aumentar a viscosidade em soluções aquosas, para formar géis com diferentes níveis de dureza, para formar películas/filmes solúveis em água e para estabilizar alguns produtos, como os gelados (inibindo a formação de grandes cristais, permitindo manter e reter a sua textura cremosa) (McHugh, 2003).

Tabela 1 - Aplicações dos Ficocolóides das macroalgas (de acordo com Pereira, 2011).

Usos	Ficocolóides	Funções
Aditivos alimentares		
Alimentos cozinhados	Ágar Kappa, Iota, Lambda	Melhorar a qualidade e controlar a humidade.
Cerveja e vinho	Alginato Kappa	Promove a floculação e sedimentação dos sólidos em suspensão.
Carnes processadas e conservadas	Alginato Kappa	Manter a humidade e textura características.
Queijo	Kappa	Dar textura.
Leite achocolatado	Kappa, lambda	Manter o cacau em suspensão.
Pudins	Kappa, Iota, Lambda	Como espessante e gelificante.

Leite condensado	Iota, lambda	Emulsificante.
Leite creme	Kappa, iota	Estabilizante da emulsão.
Recheios para tortas e bolos	Kappa	Dar corpo e textura.
Peixe congelado	Alginato	Adesão e retenção da humidade.
Sobremesas	Kappa + Iota Kappa + Iota + farinha de alfarroba	Gelificantes.
Gomas e doces	Ágar Iota	Gelificantes e texturizantes.
Sumos	Ágar Kappa, Lambda	Emulsionantes.
Gelatinas <i>light</i>	Kappa + Iota	Gelificante.
Gelados de leite	Kappa + Goma Guar, farinha de alfarroba, goma xantana	Estabilizar a emulsão e evitar a formação de cristais de gelo.
Batidos	Lambda	Estabilizar a emulsão.
Molhos para saladas	Iota	Estabilizar a suspensão.
Molhos e condimentos	Ágar Kappa	Para engrossar.
Leite de soja	Kappa + iota	Estabilizar a emulsão e melhorar a sensação na boca.
Cosméticos		
Champôs	Alginato	Na interface de vitalização.
Pasta de dentes	Carragenanas	Aumentar a viscosidade.
Loções	Alginato	Emulsificação, elasticidade e firmeza da pele.
Batons	Alginato	Elasticidade e viscosidade.
Usos medicinais e farmacêuticos		
Moldes dentários	Alginato	Retenção das formas.
Laxantes	Alginatos e Carragenanas	Indigestibilidade e lubrificação.
Comprimidos	Alginatos e Carragenanas	Encapsulamento.
Usos industriais e em laboratório		
Tintas	Alginato	Viscosidade e suspensão, vidragem.
Têxteis	Ágar, Carragenanas	Vidragem.

Fabrico de papel	Alginato, Ágar, Carragenanas	Dar viscosidade e espessar.
Separação analítica	Alginato, Carragenanas	Gelificação.
Meios bacteriológicos	Ágar	Gelificação.
Gel de electroforese	Ágar, Carragenanas	Gelificação.

▪ Ágar

No Japão, em 1658, foi descoberto este polissacarídeo que se acumula nas células das paredes de algas agarófitas (células produtoras de ágar). O seu teor varia em função da estação e condições do mar (concentração de dióxido de carbono, tensão de oxigénio, temperatura da água e intensidade de radiação solar).

O ágar é constituído por dois polissacarídeos: a agarose e a agarpectina. O primeiro é responsável pela gelificação, enquanto o último tem propriedades espessantes. A maioria do ágar é extraída a partir de espécies de *Gelidium* e *Gracilaria* (Vazhiyil Venugopal, 2011).

O ágar é insolúvel em água fria, porém expande-se consideravelmente e absorve uma quantidade de água de cerca de 20 vezes o seu próprio peso, formando um gel não absorvível, não-fermentável e com importante característica de ser atóxico (FAO, 1990).

▪ Carragenana

Os carragenatos são ingredientes naturais igualmente extraídos de algas vermelhas, que têm sido utilizados durante décadas em aplicações alimentares. Estes compostos são normalmente divididos em três tipos principais: kappa, iota e lambda e são considerados como seguros (GRAS) (Pereira, 2011).

As algas não produzem carragenanas puras, mas sim um conjunto de estruturas híbridas ou precursoras, apresentando vários tipos de polímeros (sulfatados). A quantidade exata de impurezas nestas carragenanas depende do método de extração e da alga utilizada (Silva, 2005).

Nos dias de hoje é reconhecido como um aditivo alimentar inócuo, sem valor nutricional, usado no fabrico de produtos como: batidos de leite, pudins,

iogurtes, recheios para bolos, leite com chocolate, bebidas de frutas, gelados e sorvetes, queijos, rações de animais, entre outros (FAO, 1990) (ver Tabela 1).

As carragenanas constituem assim, o terceiro hidrocolóide mais importante da indústria alimentar, atrás do amido (origem vegetal) e da gelatina animal.

▪ **Alginato**

Este polissacarídeo está presente nas paredes celulares das algas marinhas castanhas, sendo responsável pela flexibilidade da alga. Em geral, as algas que crescem em condições mais turbulentas possuem maior teor de alginato do que as em águas mais calmas (Pereira, 2011).

Em 2009, as vendas globais deste polissacarídeo foram de 318 milhões de dólares, sendo este usado em produtos como: cervejas e vinhos, carnes processadas, peixe congelado, entre outros (ver Tabela 1).

Uma boa qualidade de alginatos forma géis fortes e espessos, capazes de reter até 140 vezes o seu próprio volume de água, sendo que, o objetivo da extração do alginato da alga é obter, em pó seco, o alginato de sódio (convertendo os sais de alginato em sais de sódio, dissolvendo-os em água) (Pereira, 2011).

Hoje em dia, todas estas substâncias são cada vez mais utilizadas, quer na indústria alimentar (principal aplicação) como no sector têxtil ou na farmacêutica, alcançando em média 80% da produção mundial e com procura crescente. E uma vez que a simples recolha de algas selvagens já não consegue satisfazer a procura deste polissacarídeo, alguns países lançaram-se na cultura de algas produtoras de alginatos, que embora exigente em mão-de-obra, requer poucos investimentos (CTA, 2005).

Para além das aplicações anteriormente mencionadas, atualmente, um dos fatores que contribuem para o aumento da procura das algas é o facto de alguns dos seus metabolitos secundários demonstrarem um amplo espectro de bioatividade, incluindo antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena, antidiabética e atividade anti VIH (vírus da imunodeficiência humana) (Plaza *et al.*, 2008).

Através de resultados obtidos com algas *Laminaria spp.* no tratamento do bócio (doença com origem na dieta pobre em iodo), verificaram-se bons resultados pois este encontra-se normalmente em quantidades significativas nestas algas (Pereira, 2010).

Assim, em conclusão, as algas podem ser consideradas como fontes naturais muito interessantes que contêm novos compostos com numerosas atividades biológicas, tornando-os ingredientes funcionais com muitas aplicações industriais.

De outro ponto de vista, recentemente, Uchida e Miyoshi (2013), concluíram que a tecnologia de fermentação das algas é uma técnica com enorme potencial, mas que ainda necessita de grande desenvolvimento. Isto pode significar que partindo de algas, se consigam obter alimentos a partir da fermentação alcoólica, sem qualquer fornecimento de energia elétrica, logo, muito ecológico. Atuando estas como substratos para o ácido láctico, tratando o seu tecido com enzimas catalisadoras (celulases), na hidrólise da celulose, ocorrerá a quebra do polímero da celulose (desfavorável à fermentação).

1.5. Valores Nutricionais

Atualmente, a nossa sociedade vive uma enganadora abundância alimentar. Rodeia-nos a comida rápida, rica em calorias e gorduras insaturadas, sendo as consequências de uma alimentação deste tipo a carência de nutrientes essenciais, a obesidade e doenças relacionadas com ingestão excessiva de açúcares (diabetes) e de gorduras (arteriosclerose), entre outras (Pereira, 2008).

Assim, as algas surgem como uma alternativa de alimento saudável, adequadas ao consumo em regimes de emagrecimento.

As algas marinhas possuem polissacarídeos que se comportam, na sua grande maioria, como fibras sem valor calórico. As algas são, por isso, a melhor forma de corrigir as carências nutricionais da alimentação atual, devido ao seu variado leque de constituintes: minerais (ferro e cálcio), proteínas (com todos os aminoácidos essenciais), vitaminas e fibras (Pereira, 2008). Na tabela 2

estão esquematizados os principais constituintes nutricionais das algas marinhas.

Tabela 2 - Propriedades nutricionais das algas marinhas. (Adaptado de Patarra, 2008).

Polissacarídeos e fibras dietéticas	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Grande quantidade de polissacarídeos, especialmente os presentes nas paredes celulares. São extraídos pela indústria de hidrocolóides: alginato de algas castanhas, carragenana e ágar de algas vermelhas. ▪ Contêm também polissacarídeos de armazenamento como: a laminarina nas algas castanhas e amido florídeo nas algas vermelhas. ▪ Maiores partes destes polissacarídeos não são digeridos pelo sistema digestivo dos humanos, pois as enzimas deste não conseguem quebrar as macromoléculas que os constituem e, assim, podem ser considerados como fibras dietéticas.
Minerais	<ul style="list-style-type: none"> ▪ A fração mineral de algumas algas corresponde a 36% do peso seco total. ▪ As algas castanhas são conhecidas como fonte rica em iodo. As Laminariales (Phaeophyceae) constituem a principal fonte e podem conter entre 1500 a 8000 ppm do peso seco total. ▪ Importante fonte de cálcio. O conteúdo em cálcio pode chegar a 7% do peso seco total nas macroalgas.
Proteínas e aminoácidos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ O teor de proteínas das algas marinhas difere consoante a espécie. ▪ O conteúdo em proteínas das algas castanhas é geralmente baixo (5-15% do peso seco), enquanto as algas verdes e vermelhas apresentam valores mais elevados (10-30% do peso seco). ▪ O ácido aspártico e glutâmico constitui a maior fração de aminoácidos para a maior parte das algas marinhas.
Lípidos e ácidos gordos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Os lípidos representam apenas entre 1-5% do peso seco das algas, mas oferecem uma composição em ácidos gordos polinsaturados (PUFA's) muito interessantes, nomeadamente em ácidos gordos ω-3 e ω-6. ▪ As algas marinhas também contêm carotenóides (como o β-caroteno, luteína e violaxatina nas algas vermelhas, fucoxantina nas algas castanhas) e terpenóides.
Micronutrientes	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vitaminas: Fonte de vitamina do grupo B, vitamina C (os níveis médios variam entre os 500 e 3000 mg/Kg de peso seco nas algas verdes e castanhas, enquanto que nas algas vermelhas contém níveis compreendidos entre 100 e 800 mg/Kg) e vitamina E (as algas castanhas contêm os valores mais elevados, relativamente às algas verdes e vermelhas). ▪ Polifenóis: Os níveis mais elevados são encontrados nas algas castanhas, onde o florotanino pode variar entre 5 e 15% do peso seco.

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">▪ Carotenóides: São antioxidantes potentes. As algas castanhas são ricas em carotenóides, especialmente fucoxantina, β- caroteno e violaxantina; as algas vermelhas em β-caroteno, α-caroteno e os seus derivados dihidroxilados: zeaxantina e luteína; a composição de carotenóides das algas verdes é semelhante ao das plantas superiores: β- caroteno, luteína, violaxantina, anteraxantina, zeaxantina e neoxantina. |
|---|

As algas marinhas apresentam uma grande variação no conteúdo de nutrientes, que está relacionada com diversos fatores ambientais como a temperatura da água, a salinidade, a luz e os nutrientes disponíveis. Existem estudos que documentam a alteração da composição química das algas ao longo de vários anos devido a variações sazonais e do meio ambiente (Marinho-Soriano *et al.*, 2006). Assim, dificilmente se podem formar generalizações acerca da composição química das algas, nem mesmo dentro de uma mesma espécie.

Desta forma, torna-se necessário efetuar uma análise de todas as condições e métodos usados nos trabalhos científicos documentados sobre algas, pois estes parâmetros condicionam todos os resultados obtidos.

1.6. Antioxidantes

Os antioxidantes naturais podem ser extraídos de vegetais e plantas. Muitas ervas e especiarias, utilizadas como condimentos em alguns pratos, são excelentes fontes de compostos fenólicos. Tais substâncias têm demonstrado alto potencial antioxidante, podendo ser usadas como conservantes naturais para alimentos.

Existem diversos métodos para a extração dos compostos antioxidantes em vegetais, também conhecidos como substâncias bioativas. Dentro desses, podem ser citados os métodos tradicionais de extração utilizando solventes orgânicos (como água, etanol, éter e metanol) e a extração supercrítica, que mediante mudanças na pressão e na temperatura transforma o dióxido de carbono em fluido supercrítico (Andreo & Jorge, 2006). Sob o ponto de vista químico não há como selecionar a metodologia mais eficiente para a extração desses compostos, que podem sofrer a influência de diversos fatores, entre os

quais a natureza da planta, o solvente empregue na extração, o tamanho das partículas, o tempo e a temperatura de extração.

Dentro da indústria alimentar, os antioxidantes têm uma aplicação muito prática na conservação de alimentos, aumentando o tempo de prateleira/vida destes. Os alimentos cuja constituição é maioritariamente a gordura (por exemplo, o peixe e carne) estão sujeitos a uma forte atividade enzimática pela atuação dos lípidos, provocando a sua deterioração. Ou seja, alimentos que possuam elevado conteúdo em ácidos gordos insaturados podem ser facilmente ser oxidados durante o tempo de prateleira ou durante a sua preparação, tendo como consequência o sabor e cheiro a acre do alimento ou a formação de grupos químicos carcinogénicos, como aldeídos, hidroperóxidos, hidróxidos, entre outros (Basu *et al.*, 1999). Deste modo, é fundamental a estabilização destes grupos e a prevenção da sua formação com adição de antioxidantes. Estes possuem a capacidade de retardar a oxidação lipídica através da ligação competitiva ao oxigénio. Podem isolar as formas ativas do oxigénio envolvidas nas primeiras etapas do processo de oxidação interrompendo todo o processo, formando uma ligação estável antioxidante-radical. Esta não poderá entrar nos passos seguintes do processo de peroxidação lipídica, não permitindo também a formação de químicos indesejáveis e, como tal, a degradação das propriedades benéficas dos alimentos (Basu *et al.*, 1999).

De entre os antioxidantes sintéticos mais utilizados para preservar alimentos constam o BHA, o BHT, o GP, a TBHQ e os sorbatos (2,4-hexadienoatos). A substituição de antioxidantes sintéticos por naturais pode apresentar vantagens devido a implicações na área de saúde e na funcionalidade. Note-se por exemplo que a maior solubilidade dos antioxidantes naturais tanto em água como em óleo é útil na preparação de emulsões e outras formulações, como os hidrogéis (Cabral de Oliveira *et al.*, 2009).

Os antioxidantes na área nutricional têm tido bastante interesse visando, por exemplo, a melhoria geral da saúde e o retardamento no processo de envelhecimento, atraindo a atenção da população em geral, que deseja saber quais são os benefícios da ingestão de suplementos antioxidantes.

Atualmente já foram identificados várias moléculas com capacidade antioxidante, nomeadamente, os polifenóis. Os polifenóis são resultado da biossíntese da hidroxicinamoil coenzima A e podem ser definidos como compostos que possuem um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxilo. Representam um grande grupo de moléculas que possuem um grupo fenólico, o hidroxibenzeno (Martins *et al.*, 2011).

Dentro dos compostos fenólicos, os flavonóides são provavelmente a classe mais associada a propriedades bioativas em muitas áreas de interesse, como a cerebral. Em alguns trabalhos recentes foram-lhes atribuídas atividades importantes em processos cerebrais ligados à memória, exercendo efeitos neuroprotetores, devido a interações com macromoléculas responsáveis por caminhos de sinalizações em neurónios, fundamentais para a sobrevivência e diferenciação celulares e para a memória. Há evidências de que os flavonóides possuam impacto importante na arquitetura celular do cérebro. Como o cérebro sofre deterioração com a idade, uma dieta rica em flavonóides poderia, eventualmente, reverter o processo de deterioração (Cabral de Oliveira *et al.*, 2009).

Para além destes compostos fenólicos, existe um grupo de polifenóis abundante e exclusivo nas algas castanhas, as florotaninas, com elevada capacidade antioxidante.

As florotaninas são restritas a polímeros de floroglucinol, ajudando na prevenção do *stress* oxidativo e até como defesa química contra herbívoros marinhos. Possuem a capacidade de acumular polifenóis de peso molecular baixo, médio e elevado, assim como, são altamente hidrófilas (Sathya *et al.*, 2013).

Ainda com base no tipo de ligações estruturais, resultantes das ligações estruturais e do número de grupos hidroxilo, estas são divididas em 6 categorias: fucóis, floroetols, fucofloroetols, fualols, isofualols e eckols (Targett & Arnold, 2002). De acordo com investigações feitas efetuadas com florotaninas purificadas a partir de algas castanhas, a sua estrutura molecular pode estar associada à sua capacidade antioxidante (Targett & Arnold, 2002).

O local nestas algas (castanhas) onde se encontram a maioria dos compostos fenólicos é dentro das vesículas (physodes), no interior das células. A sua concentração foi determinada em diversas algas castanhas, tendo-se verificado valores na ordem dos 2% de massa seca de florotaninas. Deve notar-se que este nível é afetado pela época sazonal e faixa geográfica onde as algas se encontram (Targett & Arnold, 2002).

A maioria das investigações sobre florotaninas exibiu resultados interessantes, como por exemplo, diferentes mecanismos anti-diabetes (efeito inibitório da α -glucosidase e α -amilase) e efeito protetor contra as complicações com a diabetes (You-Jin & Seung-Hong, 2013).

Adicionalmente, as algas possuem ainda outros componentes que têm vindo a ser demonstrados como potenciais antioxidantes. Um desses exemplos é a fucoxantina. A fucoxantina é um pigmento de cor laranja que pertence ao grupo das xantófilas (carotenóides), dos mais abundantes na natureza. O seu conteúdo nas algas varia com época sazonal e o seu ciclo de vida. Este pigmento é bastante estável na presença de compostos orgânicos, no entanto, quando puro é muito vulnerável à oxidação (Miyashita, 2009).

O teor de fucoxantina nas algas difere entre espécies, variando entre valores 0,022 e 3,7 mg/g em amostra seca. Geralmente, os valores de fucoxantina no Inverno são mais elevados do que no Verão (Miyashita, 2009).

No entanto, há que ter em conta que apesar de todos os resultados positivos obtidos com antioxidantes “químicos”, estes podem ser simultaneamente antioxidantes “biológicos” menos eficazes, pois a maioria das evidências científicas diz respeito a atividades biológicas verificadas *in vitro*.

Referenciando a American Dietetic Association (Associação Dietética Americana), a melhor e mais correta estratégia nutricional para promover a saúde e reduzir o risco de doenças crónicas é a obtenção de nutrientes de uma grande variedade de alimentos naturais.

1.7. Objetivos

O objetivo deste trabalho é o de avaliar as propriedades nutricionais das macroalgas clorophytas *Chaetomorpha linum* e *Ulva lactuca*, da rodophyta *Gracilaria vermiculophylla* e da phaeophyta *Fucus vesiculosus*. Pretende-se ainda determinar a capacidade antioxidante de extratos obtidos a partir destas algas.

A composição nutricional será avaliada de acordo com o método de Weende e os parâmetros avaliados serão: o teor de humidade, cinzas, metais pesados e macronutrientes, extratos etéreos (gordura), proteína bruta, fibra bruta e hidratos de carbono. Ainda com o mesmo objetivo, neste trabalho alguns pigmentos, nomeadamente clorofilas, carotenóides e ficobiliproteínas.

Para avaliar a capacidade antioxidante das algas em estudo pretende-se extrair compostos bioativos com o uso de solventes orgânicos, de forma sequencial. Os extratos obtidos serão posteriormente utilizados para quantificar o total de polifenóis (teste Folin-Ciocalteu), testar a capacidade de redução do radical DPPH[•] e a capacidade de redução no teste do poder redutor.

2. MATERIAIS e MÉTODOS

2.1. Preparação de amostras

As algas que foram utilizadas para análise foram colhidas nos meses de Novembro de 2012 a Fevereiro de 2013, no estuário da Ria de Aveiro (ver Ilustração 5) localização 40°39'00.56"N, 8°39'59.35"O. Em maior detalhe, a alga *Chaetomorpha linum* e a *Gracilaria vermiculophylla* foram recolhidas em Novembro, enquanto a alga *Ulva lactuca* e a *Fucus vesiculosus* foram recolhidas em Janeiro. A respetiva identificação botânica das algas foi confirmada pelo Prof. Doutor Leonel Pereira, do Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra.

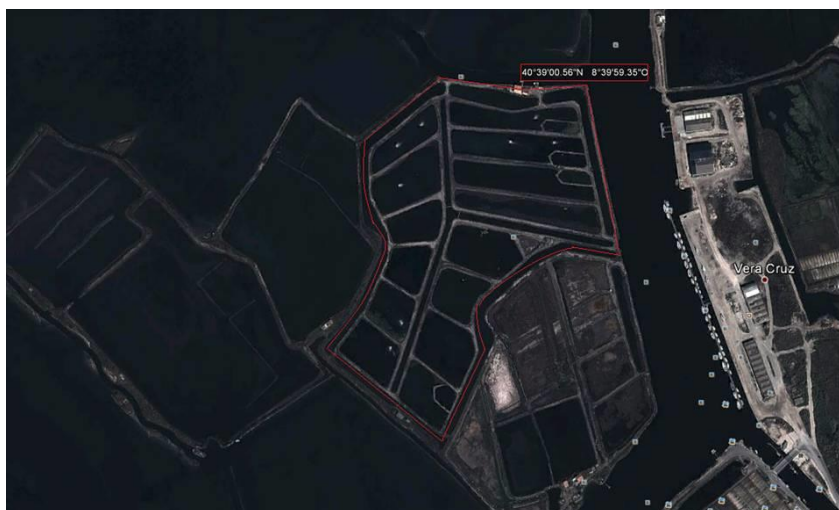


Ilustração 5 - Localização da aquarícia, local onde foram colhidas as algas em estudo.

Para a preparação das amostras procedeu-se à sua limpeza com água potável abundante, para remover organismos, areias ou outros detritos. Após esta lavagem, as algas foram lavadas em água destilada, pesadas, colocadas em sacos, congeladas a -20 °C e liofilizadas. Paralelamente, depois de lavadas e pesadas, uma parte das algas foi seca na estufa à temperatura de 65 °C, durante 24 a 48 horas a 65 °C. As amostras de algas secas (por aquecimento em estufa e por liofilização) foram moídas em moinho industrial, usando-se um

filtro com 0,5 mm de diâmetro de poro, e depois armazenadas em exsiccador até posterior armazenamento.

2.2. Métodos de Avaliação Nutricional

Todas as algas deste estudo foram avaliadas quanto ao seu valor nutricional, de acordo com o método de Weende. Este método é também conhecido como método de análise centesimal ou proximal, e foi proposto por Henneberg em 1894, com base nos resultados de investigações realizadas na Estação Experimental de Weende. Desde então, esse método vem sendo utilizado para se conhecer a composição química aproximada dos alimentos. As técnicas ainda são quase as mesmas, com exceção do nitrogénio, que é determinado hoje em dia pelo método Kjeldahl (Salman *et al.* 2010).

2.3. Determinação do teor de humidade

Todos os alimentos, qualquer que seja o método de industrialização a que tenham sido submetidos, contêm água em maior ou menor proporção. Assim, a matéria seca é toda a fração do alimento excluída a água ou humidade natural. O teor de humidade entre alimentos é muito variável, sendo que é na água presente nos alimentos que estão dissolvidos os nutrientes (hidratos de carbono, proteínas, gorduras, minerais e vitaminas) (Salman *et al.* 2010).

Para a determinação do teor de água, as cápsulas previamente secas (a 100 °C, durante 2 horas) foram pesadas na balança analítica (Sartorius Ag Gottingen, Alemanha). De seguida foram colocadas com amostra (4 g) na estufa a uma temperatura de 105 °C durante a noite (aproximadamente 10-12 horas). Após arrefecimento das cápsulas em exsiccador, foi efetuado novo registo do seu peso.

2.4. Determinação do conteúdo em fibras

As cinzas representam o resíduo obtido por aquecimento da amostra seca à temperatura de 550-570 °C. Deve notar-se que nem sempre este resíduo representa toda a substância inorgânica presente na amostra, pois alguns sais podem perder-se por volatilização (Salman *et al.* 2010).

Para determinação das cinzas, a amostra utilizada para determinação da humidade foi posteriormente levada à mufla à temperatura de 550°C (Selecta, Select Horn) durante 3 horas.

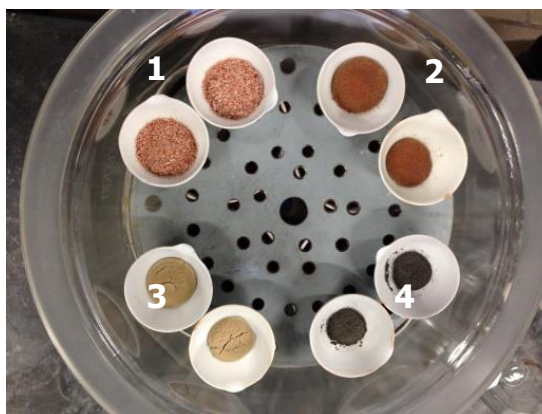


Ilustração 6 – Cadinhos com amostras depois de determinadas as cinzas (1-*Gracilaria vermiculophylla*, 2-*Ulva lactuca*, 3-*Chaetomorpha linum*, 4-*Fucus vesiculosos*).

2.5. Determinação do conteúdo de metais

As cinzas obtidas tal como descrito no item anterior foram utilizadas para determinação dos teores de minerais. Para esta determinação foi realizada uma digestão ácida com ácido nítrico a 65% (m/v), em banho-maria (Precistern Selecta, Barcelona), a 100 °C. Este processo foi repetido por mais duas vezes. Por fim, o conteúdo foi filtrado, com recurso a funil e papel de filtro, para um balão volumétrico e o volume ajustado com água destilada. Após as diluições necessárias, procedeu-se às leituras no espectrofotómetro de absorção atómica (Perkin Elmer AAnalyst 300) equipado com o cátodo correspondente a cada elemento.

Os valores referentes aos macronutrientes (cálcio, magnésio, potássio, sódio) foram expressos em gramas por 100 g de amostra seca e os metais pesados (chumbo, zinco, crômio, cobre, manganês, ferro, níquel e cádmio), foram expressos na base de miligrama por quilo de amostra seca.



Ilustração 7 - Cadinhos com amostras em digestão ácida.

2.6. Determinação do teor de gordura

A determinação do teor de gordura das algas foi efetuada por extração de amostra seca (2 g) com o solvente éter, em aparelho do tipo Soxhlet, a 40 °C durante 16 horas, seguida da remoção do solvente por evaporação em evaporador rotativo.

De notar que os resíduos obtidos não são constituídos unicamente por lípidos, mas por todos os compostos que, nas condições da determinação, possam ser extraídos pelo solvente. Esses compostos incluem ácidos gordos livres, ésteres de ácidos gordos, lecitinas, ceras, carotenóides, clorofila e outros pigmentos, fosfatídios, vitamina A e D, óleos essenciais, entre outros (Zenebron *et al.*, 2008).



Ilustração 8 - Extração com éter no aparelho Soxhlet.

2.7. Determinação do conteúdo de proteína bruta

A proteína bruta foi determinada indiretamente a partir do valor de nitrogénio total, o qual é determinado por um método que se baseia em três etapas: digestão, destilação e titulação, durante 45 minutos a 450 °C.

A matéria orgânica existente nas 2 g de cada amostra foi digerida com 12 mL de ácido sulfúrico a 80% (m/v) e um catalisador (pastilha de selénio), para que o nitrogénio fosse transformado em sulfato de amónio. De seguida, foi efetuada uma digestão com recurso a um bloco de digestão (Behr, Alemanha), a 450 °C durante 45 minutos. A amostra digerida foi arrefecida, durante 30 minutos, tendo-se de seguida procedido à neutralização com cerca de 50 mL de ácido bórico 4% (m/v) e 2-3 gotas de indicador vermelho de metilo. Após este procedimento, a amostra foi submetida a uma destilação no destilador automático do tipo Kjeldahl (Kjeltec System 1026 Distilling Unit), de forma a condensar o amoníaco libertado da amostra. Este amoníaco recuperado foi titulado com ácido clorídrico padronizado (0,09975N).

A percentagem de proteína bruta foi estimada multiplicando-se a percentagem de nitrogénio encontrada pelo fator de conversão de 6,25 (Campos *et al.*, 2004).



Ilustração 9 - Tubos digestores antes da etapa da digestão.

2.8. Determinação do teor de fibra bruta

A fibra bruta é a fração constituída por hidratos de carbono estruturais, obtida após a digestão ácida seguida de digestão básica (Salman *et al.* 2010). De notar que a principal limitação deste método está relacionada com o facto de não separar a celulose da hemicelulose e provocar a perda de parte da lignina (que não é considerada hidrato de carbono) e da hemicelulose. Este método fornece valores baixos devido à utilização de digestão muito drástica, levando à perda de alguns componentes (Salman *et al.* 2010).

A sua determinação foi realizada a partir de 2 g de amostra, a qual foi submetida a digestão com uma solução ácida, utilizando-se 200 mL de ácido sulfúrico (12,5 g/L), colocados no digestor de fibras em ebulição durante 30 minutos. Após este procedimento, procedeu-se à filtração em vácuo (em cadinho de Gooch), que foi seguida por uma digestão em meio básico, com 200mL de hidróxido de sódio (12,5 g/L), novamente colocada no aparelho Fibrotec (Labconco crude fiber extrator) em ebulição por 30 minutos. Depois de nova filtração e concluída esta etapa, os cadinhos foram levados a 130 °C durante 1 hora, seguido de posterior arrefecimento em exsiccador. O resíduo

orgânico resultante foi colocado na mufla à temperatura de 590 °C, durante 1 hora.



Ilustração 10 – Digestão básica e respectivos cadinhos de filtro.

2.9. Determinação do conteúdo em hidratos de carbono

A percentagem de hidratos de carbono nas amostras foi calculada por subtração dos componentes restantes, de acordo com a seguinte fórmula:
 $\% \text{Hidratos de Carbono} = 100\% - (\% \text{Humidade} + \% \text{Cinza} + \% \text{Proteína} + \% \text{Gordura})$.

A principal limitação dessa estimativa é que ela incorpora todos os erros das análises anteriores, principalmente da fibra bruta. Apesar disso, é considerado útil pois essa imprecisão não é demasiado significativa e a determinação é bastante rápida e simples (Salman *et al.*, 2010).

2.10. Quantificação de Pigmentos

As algas apresentam colorações extremamente variadas, mas todas têm, no entanto, clorofila. Este pigmento está no interior de pequenos organitos, os cloroplastos, responsáveis pela coloração verde da grande maioria das plantas (Pereira L., 2009).

A clorofila α é o pigmento primário de todos os organismos fotossintetizantes e está presente em todas as classes de algas; a clorofila b , que possui um espectro de absorção de luz ligeiramente diferente da clorofila α , está presente nas plantas verdes, algas verdes e euglenas; a clorofila c substitui a clorofila b em alguns tipos de algas, principalmente algas castanhas e diatomáceas (Martini *et al.* 2006).

Alguns autores, como Wetzel (1983) indicam a existência da clorofila d em certos organismos aquáticos, mas em concentrações muito baixas e sem função claramente definida.

Duas outras classes de pigmentos que estão envolvidas na captação de energia luminosa: são os carotenóides (carotenos são hidrocarbonetos lineares insaturados) e as ficobilinas (proteínas). Segundo Raven *et al.* (2001), a energia absorvida por estes pigmentos acessórios precisa ser transferida para a clorofila α , da mesma forma que a clorofila b e clorofila c .

As clorofilas e os carotenóides são lipossolúveis, enquanto as ficobilinas são hidrossolúveis. As suas funções são igualmente divergentes: enquanto os carotenóides protegem o aparelho fotossintético do *stress* foto-oxidativo, devido à elevada atividade de captar radicais (Mikami *et al.*, 2013), as ficobilinas permitem às algas vermelhas realizar a fotossíntese em profundidade (absorvendo a luz azul e refletindo a luz vermelha).

Para determinação destes pigmentos, podem ser utilizados três métodos: espectrofotometria, fluorometria e cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). Para clorofilas, o método laboratorial mais usado é o espectrofotométrico, que se baseia na absorção de luz em comprimentos de onda definidos; a fluorometria apresenta-se como método mais prático quando se deseja avaliar um número grande de pontos amostrais e para determinações *in vivo*; Por outro lado, o HPLC é útil para quantificar uma vasta gama de pigmentos fotossintéticos, incluídos clorofila α , pigmentos acessórios (como clorofilas b e c) e produtos de degradação de clorofilas (Martini *et al.* 2006).

Os ensaios efetuados apenas se concretizaram pelo método espectrofotométrico, analisando-se alguns carotenóides, clorofilas e ficobiliproteínas. Durante todos os procedimentos realizados tentaram-se

manter os extratos protegidos da luz e quando necessário, mantidos no frio, de modo a tentar evitar a luz, calor e oxigênio, fatores que causam a destruição dos pigmentos. De notar que, por limitações de equipamento (HPLC), não foi possível proceder à análise dos teores de fucoxantina na *Fucus vesiculosus*.

2.10.1. Quantificação de Clorofilas e Carotenóides

A determinação de clorofilas e principais carotenóides das algas verdes e castanhas foi efetuada de acordo com o procedimento geral descrito por Batista *et al.* (2011). Para tal pesaram-se 0,25g de amostra liofilizada e moída, à qual se adicionaram 10 mL de uma mistura de acetona-hexano (4:6). A mistura foi agitada vigorosamente durante 1 minuto e de seguida filtrada em papel Whatman n.º 4. As absorvâncias do filtrado foram registadas a 453, 505, 645 e 663 nm, no espectrofotómetro (DrLange, XION,500, Alemanha).

As concentrações das clorofilas e carotenóides foram calculadas de acordo com as seguintes equações:

$$\text{clorofila } a \text{ (mg/100mL)} = 0,999 \cdot A_{663} - 0,0989 \cdot A_{645}$$

$$\text{clorofila } b \text{ (mg/100mL)} = -0,328 \cdot A_{663} + 1,77 \cdot A_{645}$$

$$\beta\text{-caroteno (mg/100 mL)} = 0,216 \cdot A_{663} - 1,220 \cdot A_{645} - 0,304 \cdot A_{505} + 0,452 \cdot A_{453}$$

$$\text{licopeno (mg/100mL)} = -0,0458 \cdot A_{663} + 0,204 \cdot A_{645} + 0,372 \cdot A_{505} - 0,0806 \cdot A_{453}.$$

Os resultados finais foram expressos em mg pigmento por g de massa de alga seca.

2.10.2. Quantificação de Ficobiliproteínas

A quantificação de ficobiliproteínas foi efetuada de acordo com Schmidt *et al.* (2012) e Yusty *et al.* (2013). Para tal, dispersaram-se 0,25 g de amostra de alga seca e moída, em 10mL de solução de tampão fosfato 0,1 M (pH = 6,8). Com um almofariz e pilão, triturou-se a alga, que ficou em repouso durante 24 horas e à temperatura de 4 °C. Findo esse período, a mistura foi centrifugada durante 5 minutos a 5000rpm (Hettich Zentrifuga, Rotanta 460R,

Alemanha) e o sobrenadante foi lido no espectrofotômetro nas absorvâncias de 498, 614 e 651 nm.

As concentrações das diferentes ficobiliproteínas (aloficocianina, ficocianina, ficoeritrina) foram determinadas utilizando as equações de Kursar *et al.* (1983), em µg/mL:

$$\text{Aloficocianina} = 181,3 \cdot A_{651} - 22,3 \cdot A_{614}$$

$$\text{Ficocianina} = 151,1 \cdot A_{614} - 99,1 \cdot A_{651}$$

$$\text{Ficoeritrina} = 155,8 \cdot A_{498.5} - 40,0 \cdot A_{614} - 10,5 \cdot A_{651}.$$



Ilustração 11 - Alga *Gracilaria vermiculophylla* depois de triturada.

2.11. Extração de Compostos Bioativos

Para se realizar a extração de compostos bioativos em algas ou plantas é de grande importância a escolha adequada do solvente a utilizar neste processo, de modo a que o solvente escolhido dissolva compostos pelos quais possua afinidade. Outro parâmetro importante que deve ser tomado em consideração é a temperatura utilizada durante a extração, pois diferentes valores de temperatura podem promover a extração de diferentes compostos. Extrações a frio são recomendadas quando os compostos de interesse são sensíveis ou instáveis a altas temperaturas (compostos voláteis, pigmentos), enquanto extrações a quente são mais rápidas. O aumento de temperatura promove também uma maior solubilidade da substância (Seidel, 2006).

Nesta parte do estudo, foram utilizadas algas liofilizadas (2g) e moídas (crivo de moinho industrial com 0,5 mm).

As algas foram sequencialmente extraídas com *n*-hexano, metanol e água (1:20, m:v), à temperatura ambiente durante 20 minutos. Em maior pormenor, o pó obtido a partir da trituração foi colocado num gobelé com *n*-hexano na proporção de 1:3 (m:v) durante 15 minutos, em agitação, sendo posteriormente filtrado a vácuo com funil de placa sinterizada de poro G4. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes, diminuindo a coloração destes extratos à medida que iam sendo repetidos os números de filtrações, indicando que o solvente já não conseguia extrair mais componentes da amostra. O resíduo resultante da extração de *n*-hexano foi colocado num gobelé contendo metanol, na proporção de 1:3 (m:v) durante 15 minutos em agitação, sendo este procedimento efetuado por três vezes. De notar que os filtrados resultantes das extrações de *n*-hexano e metanol foram concentrados em evaporador rotativo à temperatura de 40 °C. O *n*-hexano foi totalmente evaporado e o resíduo seco resultante foi redissolvido em DMSO, enquanto o filtrado resultante da extração com metanol foi ressuspenso em água, congelado e liofilizado. O extrato de *n*-hexano foi denominado de Ext *n*-Hex, enquanto o extrato liofilizado, obtido da extração por metanol foi denominado de Ext MeOH.

Por último, o resíduo resultante da filtração com metanol e hexano foi sujeito a uma extração em água fervente (250 mL) durante o período de 2 horas. Findo este período, a mistura foi centrifugada (1000 rpm, durante 5 minutos) e o sobrenadante filtrado em funil de placa sinterizada de porosidade G4. O sobrenadante filtrado foi de seguida concentrado em evaporador rotativo (R-210 Buchi, Switzerland) a 40°C, até um volume de aproximadamente um quarto do inicial.

No caso das algas *Chaetomorpha linum* e *Fucus vesiculosus*, este sobrenadante concentrado foi sujeito a precipitação com etanol absoluto, na proporção de 1:3 (v:v). Após precipitação, o sobrenadante foi recuperado por filtração e sujeito a evaporação à pressão reduzida para eliminação do etanol. A solução aquosa resultante foi congelada e liofilizada, dando origem ao extrato denominado de sobrenadante etanol (Ext SnEtOH). Por outro lado, o precipitado de etanol foi seco em estufa à temperatura de 40 °C durante 24

horas. O extrato seco resultante foi denominado de precipitado de etanol (Ext ppEtOH).

Deve realçar-se que na *Ulva lactuca* não se obteve o resíduo no filtro (Ext ppEtOH) após a filtração da solução etanólica. Devido à inexistência de polissacarídeos de cadeia longa, apenas se concentrou o sobrenadante de etanol e seguiu para liofilização, obtendo-se apenas o Ext SnEtOH.

No caso da alga *Gracilaria vermiculophylla*, o extrato aquoso foi centrifugado, e o sobrenadante resultante foi filtrado em funil de porosidade G4 e de seguida foi concentrado no evaporador rotativo, dando origem ao extrato de água (Ext H₂O).

2.12. Quantificação total de polifenóis – Teste Folin-Ciocalteu

O reagente Folin é formado a partir de uma mistura de ácido fosfotúngstico e de ácido fosfomolibdico, o qual, após a oxidação dos fenóis, é reduzido a uma mistura de óxidos azuis de tungsténio e molibdénio. A cor azul produzida tem um máximo de absorção na região de 765nm e é proporcional à quantidade total de compostos fenólicos presentes originalmente (Bajcan *et al.*, 2013).

As amostras obtidas (tal como descrito na secção 2.11) foram preparadas nas concentrações de 2,5, 5 e 10 mg/mL (água destilada), para extratos do SnEtOH, ppEtOH e H₂O.

A quantidade total de polifenóis foi avaliada pelo método de Folin-Ciocalteu. Num tubo de ensaio, adicionou-se 1500µL de água destilada, 100µL de amostra e 100µL de reagente de Folin-Ciocalteu (FlukaBiochemika, Sigma Aldrich, Suíça). Após 2 minutos adicionou-se 300µL de solução carbonato de sódio, Na₂CO₃ a 20% (m/v). A reação foi incubada à temperatura de 40°C durante 30 minutos, após a qual se mediu a absorvância a um comprimento de onda de 765 nm num espectrofotómetro (DrLange, XION,500, Alemanha). O ácido gálico (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha) foi usado como padrão para a curva de calibração.

A quantidade total de polifenóis foi expressa em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de extrato. Todas as amostras foram analisadas em duplicado.

2.13. Avaliação da capacidade antioxidante –

Método de captação de radicais livres (DPPH•)

O radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH•) é caracterizado como sendo estável, devido à deslocalização do electrão livre sobre a molécula. Por essa razão, este radical é utilizado para determinar o potencial de neutralização de radicais livres. Assim, quando uma solução de DPPH•, com cor violeta escuro, é misturada com uma substância que possa doar o seu átomo de hidrogénio, este passa à sua forma reduzida e ocorre a perda de cor para violeta claro (Molyneux, 2004). Este método é tecnicamente simples, rápido e pouco dispendioso necessitando apenas de se recorrer a um espectrofotómetro para realizar as leituras de absorvância.

No presente trabalho, a atividade sequestradora de radicais livres foi avaliada e determinada de acordo com o método de Pereira *et al.* (2013) com algumas modificações. Para a determinação da atividade antioxidante foi utilizada uma solução metanólica $7,6 \times 10^{-5}$ M de DPPH• (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha) e os extratos foram preparados num *eppendorf* com diferentes concentrações. Foram realizados alguns ensaios, variando sobretudo as concentrações das amostras de extratos preparados, de modo a podermos avaliar quais teriam mais potencialidades antioxidantes. Foram considerados os seguintes: na *Chaetomorpha linum*, *Ulva lactuca* e *Fucus vesiculosus* os Ext MeOH, Ext snEtOH e Ext ppEtOH, liofilizados, e na *Gracilaria vermiculophylla* o Ext MeOH e Ext H₂O, também liofilizados. As concentrações preparadas variavam, consoante a capacidade antioxidante de cada extrato, nos valores de 2,5; 3,0; 4,5; 5,0; 7,5; 10 e 15 mg/mL.

Colocou-se em cada tubo de ensaio várias quantidades da solução de extrato (10, 25, 50, 75 e 100 µL) e completou-se o volume (100 µL) com água destilada. Juntou-se 1,9 mL de solução de DPPH• e agitou-se no vórtex.

Guardou-se no escuro os tubos durante 30 minutos à temperatura ambiente e efetuou-se a leitura da absorvância no espectrofotómetro (Dr Lange, XION 500, Germany) a 517 nm. Anteriormente o espectrofotómetro foi calibrado com metanol.

O controlo contém todos os reagentes exceto o extrato (substituído por solvente no controlo). Determinou-se a percentagem de inibição para cada concentração através da fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{Abs_C - Abs_E}{Abs_C} \times 100$$

Abs_C : Absorvância do controlo

Abs_E : Absorvância do extrato após 30 minutos ao escuro

Utilizou-se o ácido ascórbico (Sigma Aldrich, USA) (0,053 mg/mL) como padrão, numa gama de concentrações de 0,001; 0,002; 0,003; 0,005; 0,006 e 0,012 mg/mL.

2.14. Avaliação da capacidade antioxidante – Método do Poder Redutor

Os compostos antioxidantes causam a redução de Fe³⁺ para Fe²⁺, devido às suas capacidades redutoras. O complexo azul é formado pela adição de FeCl₃ a Fe²⁺, assim a redução é determinada medindo-se a formação da cor azul ou verde, a 700 nm. Neste ensaio, a cor amarela das soluções férricas é alterada, dependendo do poder redutor das amostras, sendo que, quanto maior a absorvância, maior o poder redutor (Kiran R. *et al.*, 2012).

A atividade do poder redutor foi determinada de acordo com o método de Kiran *et al.* (2012) com algumas modificações.

Foram usadas diferentes quantidades (85, 165, 250, 315, 375 e 500 µL) de uma solução aquosa de extrato (12,5 mg/mL) e o volume de 500 µL foi completado com água destilada. Juntou-se 2,5 ml de tampão fosfato (0,2 M e pH 6,6), 2,5 mL de K₃Fe(CN)₆ (1% m/v) e agitou-se no vórtex. Após 20 minutos de incubação a 50 °C adicionou-se 2,5 mL de TCA (10% m/v) e agitou-se novamente no vórtex. Transferiu-se de cada tubo de ensaio 2,5 mL de solução

para novos tubos de ensaio. Neste novo tubo de ensaio, adicionou-se 2,5 mL de água destilada, 0,5 mL de FeCl_3 (0,1% m/v) e agitou-se no vórtex. Efetuou-se a leitura da absorvância no espectrofotômetro (Dr Lange, XION 500, Germany) a 700 nm. Anteriormente acertou-se o zero no espectrofotômetro com um controle, que contém todos os reagentes exceto o extrato (substituído por solvente).

Os resultados foram expressos em absorvância (700 nm) vs concentração extrato. Para comparação usou-se o BHA (1 mg/mL) como padrão (controle positivo), nas concentrações de 0,008; 0,011; 0,013; 0,016; 0,024 e 0,032 mg/mL.

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

3.1. Avaliação Nutricional

Os valores de humidade encontrados nas diferentes algas variaram entre 81,2 e 94,5% (Tabela 3), sendo este valor mais elevado na alga *Chaetomorpha linum* e mais baixo na alga *Gracilaria vermiculophylla*. Estes valores são concordantes com o descrito por Marinho-Soriano *et al.* (2006) demonstrando que os teores de humidade nas algas marinhas são elevados e podem chegar aos 94%. No entanto deve salientar-se que o valor de humidade obtido neste trabalho para a alga *Ulva lactuca* (93,6% \pm 1,52) é significativamente superior aos valores obtidos por Mota da Silva *et al.* (2008), que descreveram um valor de apenas 84% de humidade. Já para as espécies do género *Gracilaria* e *Fucus* estudadas por Holdt & Kraan (2011) apresentaram um valor semelhante (85 e 81%, respetivamente) aos encontrados no presente estudo para as espécies *Gracilaria vermiculophylla* (81,2%) e *Fucus vesiculosus* (83,5%).

A discrepância entre os valores encontrados com os anteriormente descritos pode dever-se à idade das amostras, localização geográfica, fatores ambientais e estação sazonal. Assim, fazer qualquer tipo de generalizações não faria sentido, uma vez que estes dados fornecem valores instantâneos, não refletindo, por exemplo, variações sazonais (Madden *et al.*, 2012).

Os valores de energia total expressa em kcal estão dentro dos descritos anteriormente por Applegate e Gray (1995). Estes autores obtiveram os valores de 15,2 kJ/g amostra seca (i.e. 3,6 kcal/g amostra seca) para a *Fucus vesiculosus*, o que é um valor muito semelhante ao resultado agora obtido (3,0 kcal/g de amostra seca).

Tabela 3 - Valores de humidade e energia total das 4 algas.

	<i>Chaetomorpha linum</i>	<i>Ulva lactuca</i>	<i>Gracilaria vermiculophylla</i>	<i>Fucus vesiculosus</i>
Humidade (%)	94,6 \pm 1,6	93,6 \pm 1,5	81,2 \pm 4,2	83,5 \pm 5,6
Energia Total (kcal/100g amostra seca)	258,0	310,5	319,1	301,5

Tal como pode ser observado na Ilustração 12, o valor das cinzas das algas variou entre 20,2 e 35,5%, sendo este valor superior na alga verde *Chaetomorpha linum* e inferior na alga vermelha. No geral, estes valores estão de acordo com o descrito por Fleurence (1999), que indicou que os valores de cinzas nas algas são variáveis entre 8 a 40% do seu peso seco. Todos os valores encontrados foram também superiores aos descritos para as plantas terrestres (5 –10 %) (USDA, 2001).

Ainda, os valores agora encontrados para a *Ulva lactuca* (22,4%) são próximos dos descritos por Wong (2000) para a mesma alga, enquanto aqueles das algas *Gracilaria vermiculophylla* (20,2%) e da alga *Fucus vesiculosus* (24,6%) são próximos dos descritos por Polat e Ozogul (2008) para algas vermelhas e castanhas (17,9 e 27,1%, respetivamente).

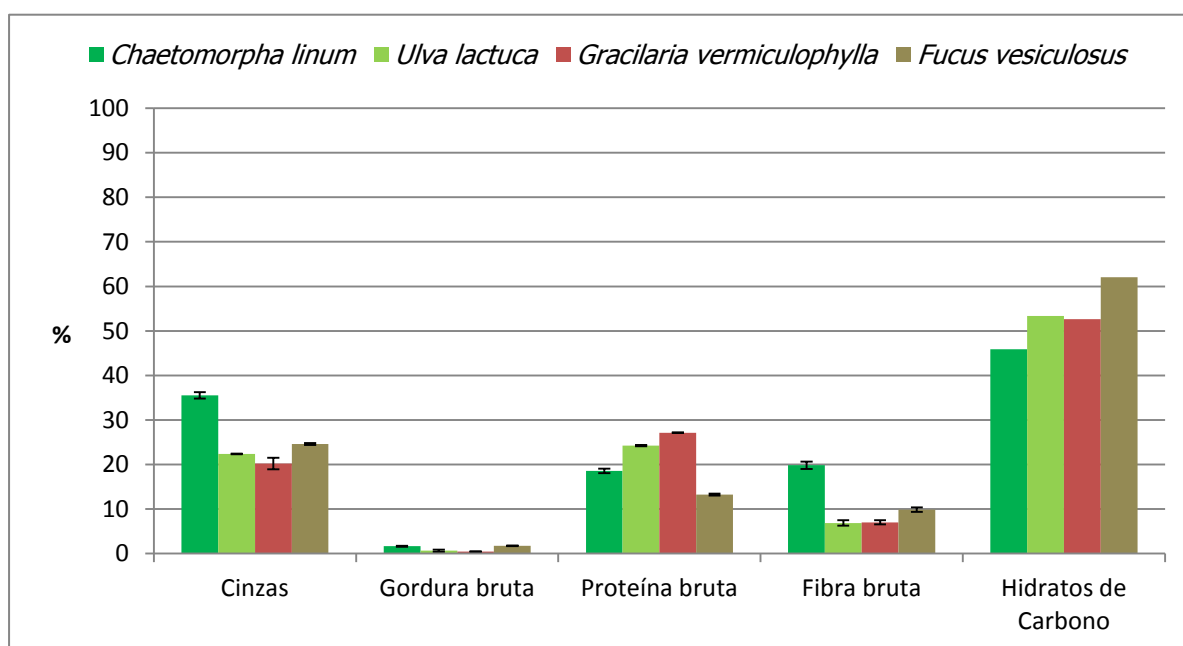


Ilustração 12 - Composição nutricional das algas *Chaetomorpha linum*, *Ulva lactuca*, *Gracilaria vermiculophylla* e *Fucus vesiculosus*. Os valores são expressos relativamente à matéria seca (%) e correspondem à média \pm desvio-padrão da média (n=3).

Os valores de gordura bruta foram inferiores na alga vermelha com um valor de $0,4 \pm 0,1\%$ massa seca e superiores na alga castanha com um valor de $1,7 \pm 0,1\%$ massa seca. Deve assim concluir-se que os valores obtidos neste estudo são inferiores ao descrito no estudo de Polat e Ozogul (2008), que

descreveram valores de gordura de 1,1 e 11,5% de massa seca, para as algas vermelhas e castanhas, respetivamente.

Os valores de proteína nas quatro algas variaram entre 13,2 e 27,1%, sendo a alga *Gracilaria vermiculophylla* a mais rica em proteína, enquanto a alga *Fucus vesiculosus* foi a que apresentou valores mais baixos. Valores semelhantes foram descritos por Patarra *et al.* (2011), na *Chlorophyta Ulva compressa* (26,6% massa seca) e na *Phaeophyta Fucus spiralis* (10,8% massa seca).

No geral, todos os valores de fibra bruta obtidos neste trabalho foram inferiores aos descritos na literatura (Patarra *et al.* 2011). Isto deve-se ao facto de o método utilizado, tal como já foi referido na secção 2.8, ser bastante drástico, levando à perda de alguns componentes (como a lignina ou a hemicelulose).

Neste trabalho, o valor mais elevado foi encontrado na alga *Chaetomorpha linum* com 19,8% massa seca. Nos trabalhos de Rupérez e Saura-Calixto (2001) foi encontrado um valor de 41,2% massa seca para a *Ulva compressa*, que é cerca de 6 vezes superior ao encontrado na *Ulva lactuca* agora descrita. No caso das algas vermelhas, os valores referidos por esses autores foram de 41% massa seca (género *Porphyra sp.*) e de 50,1% para a *Fucus vesiculosus*, contra apenas 7% e 9,9%, respetivamente, aqui encontrados.

A alga castanha foi a que revelou possuir maior quantidade de hidratos de carbono (62%). A alga *Ulva lactuca* possuía 53,4%, que é um valor próximo do anteriormente descrito por Kim *et al.* (2011) para a mesma alga (54,3% massa seca). Ainda, Hwang *et al.* (2008) referiram os valores de 45,3% e 51,1%, para as *Chlorophytas Capsosiphon fulvescens* e *Ulva prolifera*, respetivamente.

Os resultados obtidos neste trabalho diferem em muitas vezes dos descritos pela literatura, refletindo a influência da origem geográfica, clima e época, assim como, as diferenças ambientais ou metodologias de amostragem.

Sabe-se também que o método de secagem pode afetar significativamente o valor nutricional das algas (Chan *et al.*, 1997). Este parâmetro deve assim ser considerado. Na verdade, se bem secas, as algas podem ser armazenadas por um determinado número de anos, sem perda significativa do seu teor. No entanto, em alguns trabalhos aqui descritos, as amostras foram secas à temperatura ambiente (25 °C), desidratadas à luz solar ou imediatamente liofilizadas.

▪ Metais Pesados e Macronutrientes

Os resultados referentes aos metais pesados encontram-se apresentados na tabela 4, sendo os de maior expressão em todas as algas, o manganês (Mn) e o ferro (Fe).

O teor de Mn teve maior valor na alga castanha em estudo ($311,8 \pm 33,0$ g/kg amostra seca). Dados de Rupérez *et al.* (2002), demonstram resultados para o género *Fucus* sp. cerca de 5 vezes inferior (55 mg/kg amostra seca, sem diluição).

O teor em Fe foi superior na *Gracilaria vermiculophylla* ($258,85 \pm 21,24$ mg/kg amostra seca) e inferior na *Fucus vesiculosus* ($120,08 \pm 9,32$ mg/kg amostra seca), tendo sido o valor intermédio obtido na *Ulva lactuca* (121,2 mg/kg amostra seca). De notar que este último valor é inferior ao descrito por Storelli *et al.* (2001), com 337 mg/kg amostra seca. No entanto, o valor encontrado na alga castanha é superior aos valores descritos na literatura (42 mg/kg amostra seca) (Rupérez, 2002).

Ainda no estudo anterior, os autores afirmaram que as macroalgas marinhas necessitam de acumular Fe para o seu normal crescimento, podendo acumular o disponível no meio, quando existe em abundância. Além disso, pode-se dizer que o sedimento e o material constituído por partículas em suspensão representam os principais reservatórios que regulam a concentração dos elementos na fração dissolvida e, desta, para as algas marinhas (Amado-Filho *et al.*, 1997). De acordo com isto, também os resultados de Carvalho *et al.* (2002) apontam para a elevada capacidade de transporte de Fe e Mg ligado ao

material em partículas em suspensão no ambiente marinho. Estes dados podem reforçar as elevadas concentrações de Fe determinadas nas espécies de macroalgas marinhas no presente estudo.

Quanto ao valor de chumbo (Pb), obtido em maior quantidade na alga castanha (9,35 mg/kg amostra seca, sem diluição), foi superior ao limite para algas edíveis, em França, de 5 mg/kg amostra seca (Besada *et al.*, 2009).

O valor de zinco (Zn) teve maior expressão na alga castanha (98,4 mg/kg amostra seca) e foi, igualmente superior aos 37,1 mg/kg amostra seca, para o género *Fucus* sp. referidos por Rupérez *et al.* (2002).

Relativamente aos resultados obtidos no presente estudo para as concentrações de crómio (Cr) e cobre (Cu), estas podem ser consideradas reduzidas ($10,1 \pm 0,6$ a $15,8 \pm 0,5$ mg/kg e $8,7 \pm 1,6$ a $18,1 \pm 1,9$ mg/kg, respetivamente), estão próximos dos descritos na literatura (Machado *et al.*, 2003). Tal facto sugere que o local de onde provêm as algas em estudo é uma área natural ou levemente impactada por metais pesados.

Os valores de níquel (Ni) e cádmio (Cd) estão presentes em quantidades residuais e são inferiores ao seu limite de quantificação. Por essa razão, os valores aqui apresentados servem apenas para termo de comparação relativamente aos outros metais.

Tabela 4 - Representação dos valores obtidos na determinação dos metais pesados, em mg/kg.

	<i>Chaetomorpha linum</i>	<i>Ulva lactuca</i>	<i>Gracilaria vermiculophylla</i>	<i>Fucus vesiculosus</i>
Pb	$8,3 \pm 1,4$	$3,7 \pm 0,72$	$8,0 \pm 0,7$	$9,4 \pm 0,1$
Zn	$36,95 \pm 5,7$	$31,1 \pm 3,8$	$43,8 \pm 6,3$	$98,4 \pm 4,6$
Cr	$11,6 \pm 0,8$	$10,1 \pm 0,6$	$11,2 \pm 2,3$	$15,8 \pm 0,5$
Cu	$8,7 \pm 1,6$	$18,1 \pm 1,9$	$17,9 \pm 2,0$	$15,7 \pm 0,9$
Mn	$44,9 \pm 5,7$	$190,8 \pm 18,0$	$203,8 \pm 16,8$	$311,8 \pm 33,0$
Fe	$252,3 \pm 20,4$	$121,2 \pm 17,2$	$258,9 \pm 21,2$	$120,1 \pm 9,3$
Ni <LQ	$7,0 \pm 1,3$	$6,97 \pm 0,7$	$4,9 \pm 0,8$	$10,3 \pm 0,9$
Cd <LQ	$0,1 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,1$	$0,0 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$

Os valores relativos aos macronutrientes cálcio (Ca), magnésio (Mg), potássio (K) e sódio (Na), encontram-se descritos na Tabela 5. Destes resultados é possível concluir que os valores mais altos de Ca e Na foram detetados na alga castanha, enquanto o Mg foi mais elevado na *Ulva lactuca* e o de K, na *Chaetomorpha linum*.

O valor de K de 2,25 g/100g amostra seca está descrito por Sivakumar e Arunkumar (2009) para a *Ulva lactuca*, sendo este um teor aproximado ao encontrado neste estudo (1,93 g/100g amostra seca) para a mesma alga. Já para a *Gracilaria* spp. foi descrito, por Cardoso *et al.* (2013), valores de 3,4 g/100g amostra seca e para a *Fucus vesiculosus* entre 2,5 e 4,3 g/100g amostra seca, ambos concordantes com os resultados agora encontrados.

De forma semelhante, o conteúdo de Na aqui determinado para a *Ulva lactuca* (17,2 mg/g amostra seca) foi próximo do previamente descrito também por Sivakumar e Arunkumar (2009) (25,9 mg/g amostra seca). Na *Gracilaria* spp. foi igualmente descrito, por Cardoso *et al.* (2013), valores de 5,5 g/100g amostra seca (superior ao obtido) e para a *Fucus vesiculosus* entre 2,5 e 5,5 g/100g amostra seca, de novo resultados concordantes.

O nível de cálcio teve o valor mais elevado na *Fucus vesiculosus* com 0,97 g/100g amostra seca, dentro do descrito na literatura com valores entre 0,72 e 0,94 g/100g amostra seca (Cardoso *et al.*, 2013). Ainda pelos mesmos autores, para algas *Gracilaria* spp. são referidos 0,40 g/100g amostra seca (inferior ao obtido na *Gracilaria vermiculophylla*) e na *Ulva lactuca* são referidos 0,84 g/100g amostra seca (superior ao encontrado).

O valor de Mg obtido na *Fucus vesiculosus* está igualmente entre os referidos de 0,67 e 1,0 g/100g amostra seca (Cardoso *et al.*, 2013). Tal como, o valor obtido na *Ulva lactuca*, de acordo com MacArtain *et al.* (2007) para o género *Ulva* spp..

Tabela 5 - Representação dos valores obtidos na determinação dos macronutrientes, em g/100g amostra seca.

	<i>Chaetomorpha linum</i>	<i>Ulva lactuca</i>	<i>Gracilaria vermiculophylla</i>	<i>Fucus vesiculosus</i>
Ca	0,26 ± 0,03	0,45 ± 0,04	0,50 ± 0,13	0,97 ± 0,05
Mg	0,82 ± 0,12	2,44 ± 0,44	0,24 ± 0,05	0,80 ± 0,11
K	7,67 ± 1,39	1,93 ± 0,12	3,76 ± 0,33	2,94 ± 0,31
Na	1,86 ± 0,11	1,72 ± 0,06	0,71 ± 0,06	3,26 ± 0,05

3.2. Pigmentos

▪ Algas Verdes

Observando os valores relativos à quantidade de pigmentos e fazendo uma comparação do conteúdo de clorofila α nas duas algas verdes verifica-se que a *Chaetomorpha linum* apresentou valores muito superiores à *Ulva lactuca*.

Por sua vez, comparando estes resultados com os obtidos por Raymundo *et al.* (2004) para a alga *Chaetomorpha anteninna*, os valores de clorofila α foram 0,15 mg/g de alga fresca, ou seja, são ligeiramente superiores aos agora encontrados (0,06 mg/g alga fresca *Chaetomorpha linum*).

O conteúdo de clorofila β é igualmente superior na alga *Chaetomorpha linum*. Na literatura, El-Baky *et al.* (2008), descreve 3,62 mg/g alga fresca na *Ulva lactuca*, valor superior ao aqui obtido (0,004 mg/g alga fresca).

O teor de β -caroteno aqui obtido para a *Chaetomorpha linum* foi de 0,40 mg/g alga seca (0,02 mg/g alga fresca), valor inferior ao descrito na espécie *Chaetomorpha anteninna* (0,12 mg/g alga fresca) (Raymundo *et al.*, 2004). Na alga verde *Ulva lactuca* foram obtidos 0,07 mg/g alga seca (i.e. 0,004 mg/g alga fresca), novamente inferior ao descrito com a alga *Ulva fasciata* com 0,07 mg/g alga fresca (Raymundo *et al.*, 2004).

Ainda recorrendo a dados na literatura existem alguns autores que relatam a existência de β -caroteno nas algas verdes *Enteromorpha spp.* (género *Ulva*) contendo maiores quantidades que as existentes em alguns

vegetais amarelo-esverdeados, nas quantidades de 0,22 a 0,25 mg/g alga fresca. Ainda assim, esses dados não foram constatados no presente estudo, tendo sido observados valores aproximadamente 11 e 55 vezes inferiores nas algas *Chaetomorpha linum* e *Ulva lactuca*, respetivamente.

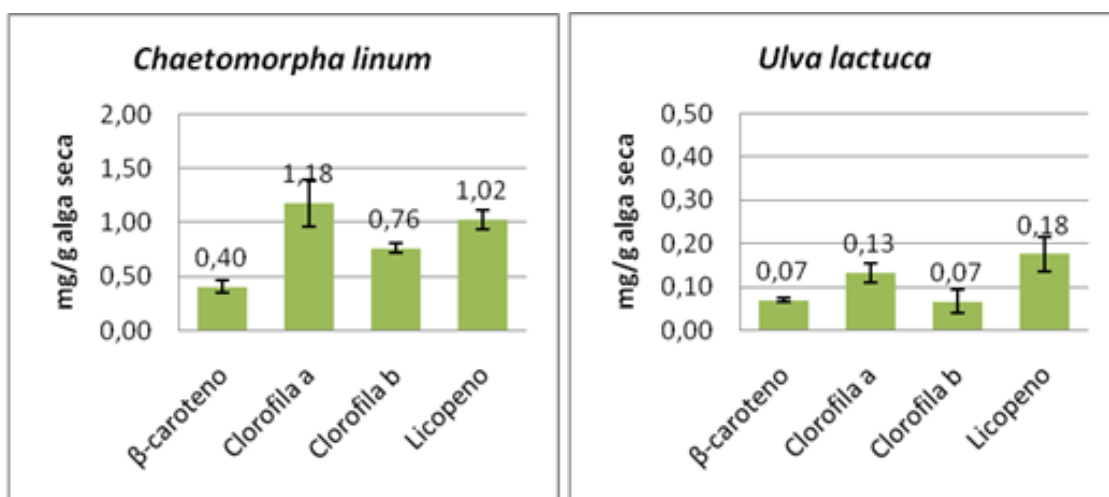


Ilustração 13 - Gráfico dos compostos quantificados nas algas verdes, em mg/g alga seca (média \pm DP, n=3).

O licopeno é um antioxidante especialmente estudado a partir de extrações do tomate, a partir do qual inúmeras pesquisas foram realizadas. Assim, observando resultados de Garcia & Barret (2005), com várias cultivares de tomate, são descritos valores entre 0,08 e 0,09 mg/g de tomate fresco. Na alga *Chaetomorpha linum* obtiveram-se resultados não muito distantes (0,06 mg/g alga fresca).

▪ Algas Vermelhas

Os valores obtidos em clorofila α para a *Gracilaria vermiculophylla* foram bastante reduzidos quando comparados aos resultados nas algas verdes. Tal facto era espectável, uma vez que o pigmento predominante das primeiras é a clorofila, enquanto o pigmento mais abundante nas algas vermelhas é a ficoeritrina.

De acordo com um estudo efetuado por Kumar *et al.* (2009), com algumas espécies de algas vermelhas, concluiu-se que, nas Rhodophytas os valores de clorofila α variavam entre 0,58 e 1,96 mg/g de alga fresca.

Comparando estes valores com os obtidos na *Gracilaria vermiculophylla*, verificou-se que os resultados obtidos neste trabalho (0,06 mg/g alga seca, ou seja, 0,01 mg/g alga fresca) foram inferiores ao descrito na literatura.

O β -caroteno foi apenas detetado em quantidades residuais. Recorrendo à literatura consegue perceber-se que os resultados obtidos estão um pouco inferiores aos valores do género *Gracilaria*. Na literatura, Sousa *et al.* (2008) descreve 0,003 mg/g alga fresca, enquanto no presente trabalho o valor encontrado foi de 0,0009 mg/g alga fresca.

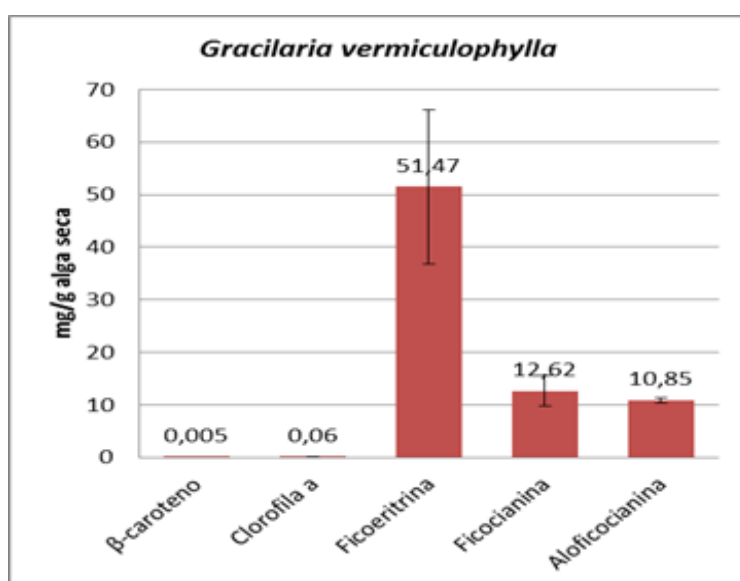


Ilustração 14 - Gráfico dos compostos quantificados nas algas vermelhas, em mg/g alga seca (média \pm DP, n=3).

No mesmo trabalho é referido o teor de ficoeritrina para as algas vermelhas em estudo, entre os 10,20 a 24,64 mg/g alga fresca. No entanto, os resultados aqui obtidos não alcançaram os valores descritos (51,47 mg/g alga seca, ou seja, 9,67 mg/g alga fresca).

Os resultados obtidos na ficocianina foram menos representativos que os da ficoeritrina, no entanto, mais representativos que o encontrado na literatura. Isto porque, de acordo com Denis *et al.* (2010), na alga vermelha *Grateloupia turuturu* foram encontrados valores apenas entre 0,01 a 0,04 mg/g alga seca.

A aloficocianina foi encontrada com valor médio de 10,85 mg/g alga seca. De acordo com Stein (2010), este pigmento encontra-se também sempre

presente em menor quantidade que a ficoeritrina e a ficocianina (estudo conduzido com várias Rhodophytas do género *Laurencia*).

▪ Algas Castanhas

O resultado do carotenóide β -caroteno na alga *Fucus vesiculosus* apresentou um valor reduzido (0,17 mg/g alga seca, ou seja, 0,028 mg/g alga fresca). De acordo com outros ensaios, obtiveram-se resultados próximos dos descritos em várias macroalgas marinhas, pertencentes à divisão Phaeophyta, com valores de 0,27 a 12,23 μ g/g alga fresca (Sousa *et al.*, 2008).

O licopeno foi o pigmento com maior expressão na alga castanha. Igualmente comparando com o estudo realizado com várias cultivares de tomate, o valor obtido de 0,32 mg/g alga seca (equivalente a 0,05 mg/g alga fresca) encontra-se dentro dos valores descritos para o tomate.

Quanto à clorofila b foram obtidos valores de 0,18 mg/g alga seca, ou seja, 0,029 mg/g alga nativa. Resultados ligeiramente inferiores aos descritos por Kumar *et al.* (2009), para Phaeophytas estudadas nesse ensaio, com valores entre 0,09 e 0,46 mg/g alga fresca.

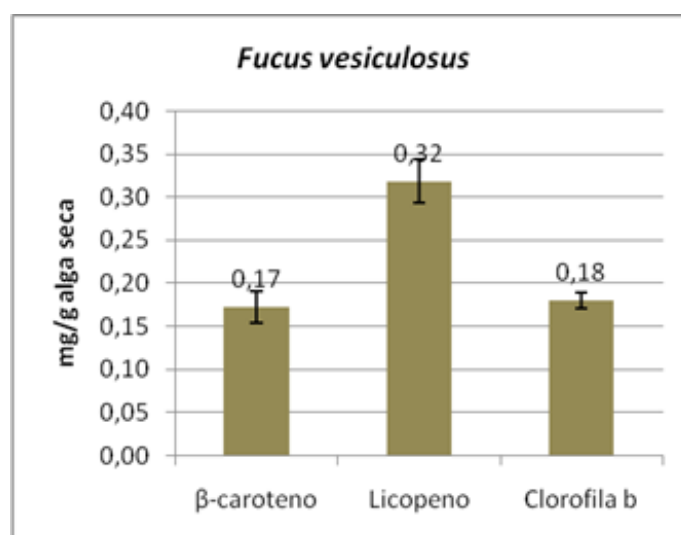


Ilustração 15 - Gráfico dos compostos quantificados nas algas castanhas, em mg/g alga seca (média \pm DP, n=3).

3.3. Extrações de compostos bioativos

Como pode ser observado no gráfico seguinte, o extrato de nHex mais representativo foi o da *Fucus vesiculosus* (15,4%), enquanto o extrato predominante de metanol foi obtido para a alga *Chaetomorpha linum* (23,6%).

Os extratos resultantes da extração com água foram no geral os mais representativos, representando na *Gracilaria vermiculophylla* 55,4% da massa seca daquela alga. Nesta extração com elevado rendimento são essencialmente obtidos polissacarídeos, extraídos apenas pela concentração da solução aquosa (vácuo por tromba de água e banho a 50°C).

Em relação aos extratos resultantes da precipitação com etanol (obtido nas algas *Chaetomorpha linum* e *Fucus vesiculosus*), este foi superior na alga castanha, representando 5,67% da sua massa.

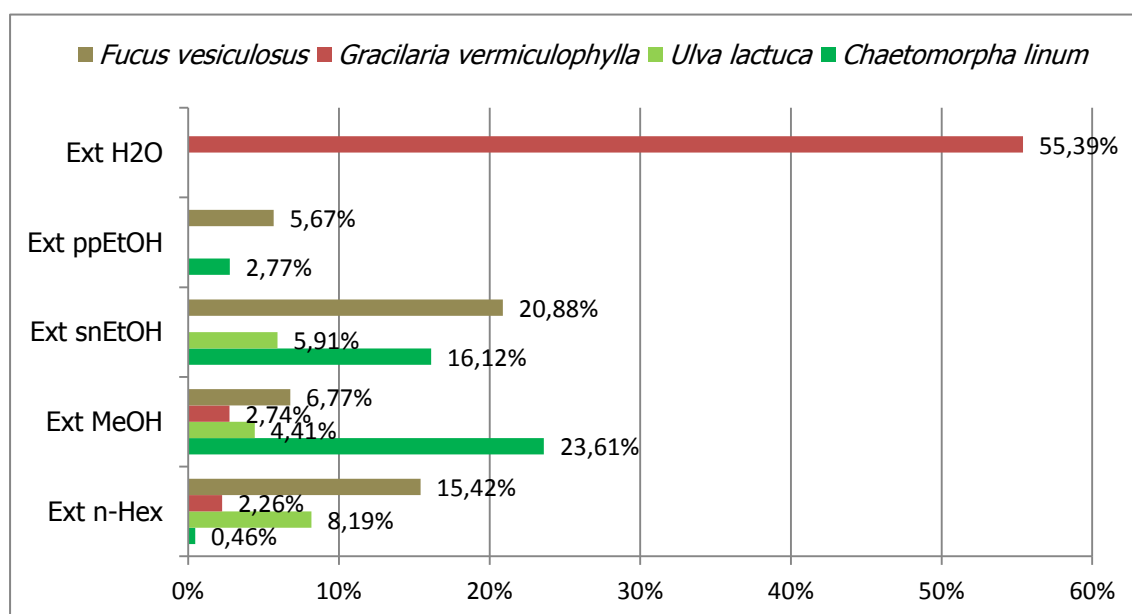


Ilustração 16 - Gráfico representativo dos rendimentos de extração obtidos com os diferentes solventes.

Na alga verde *Chaetomorpha linum*, a extração com maior rendimento ocorreu com o solvente metanólico, alcançando os 23,6% massa seca. Na literatura é apresentado um valor inferior, por Schultz-Jensen *et al.* (2013), com a mesma extração nessa alga (15,6%).

Para a *Ulva lactuca*, os valores de rendimento das diferentes extrações feitas foram de 4,4% a 8,2%, não alcançando os descritos numa extração com diclorometano-metanol com 12,3% na mesma alga (El-Baky *et al.*, 2008).

Relativamente à alga vermelha *Gracilaria vermiculophylla*, obteve-se um rendimento elevado na extração aquosa a quente (55,4%). De acordo com Souza *et al.* (2012), para a *Gracilaria birdiae*, para o mesmo tipo de extração é descrito apenas metade do rendimento obtido (27,2%).

A alga castanha teve maior rendimento na extração aquosa (20,9%). De acordo com publicação de Rajauria *et al.* (2012), o valor obtido na extração metanólica da alga castanha *Himanthalia elongata* foi apenas 1,2% massa seca, que é bastante inferior ao valor obtido na alga castanha do presente estudo (6,8% massa seca).

3.4. Avaliação da quantidade de Compostos Fenólicos

Os resultados finais obtidos pelo teste de Folin-Ciocalteu estão representados no gráfico (Figura 17), expresso em microgramas de equivalente de ácido gálico por miligrama de extrato seco ($\mu\text{g EAG/mg}$).

Na *Chaetomorpha linum*, o teste foi efetuado nos extratos snEtOH e ppEtOH. O extrato de *n*-Hex (com massa muito reduzida) e o extrato MeOH (não liofilizado) não foram considerados. Na *Ulva lactuca*, o teste foi efetuado nos extratos MeOH, snEtOH e ppEtOH. Embora o extrato de *n*-Hex tenha sido ensaiado, os seus valores foram abaixo do limite de deteção do método, logo não representado.

Na *Gracilaria vermiculophylla*, o teste foi efetuado nos extratos MeOH e H₂O, tendo o extrato de *n*-Hex sido desprezado por falta de representatividade (massa demasiado baixa).

O extrato de *n*-Hex da alga *Fucus vesiculosus* foi igualmente desprezado porque foram obtidos resultados muito díspares nos seus rendimentos de extração. Assim, os extratos MeOH, snEtOH e ppEtOH.

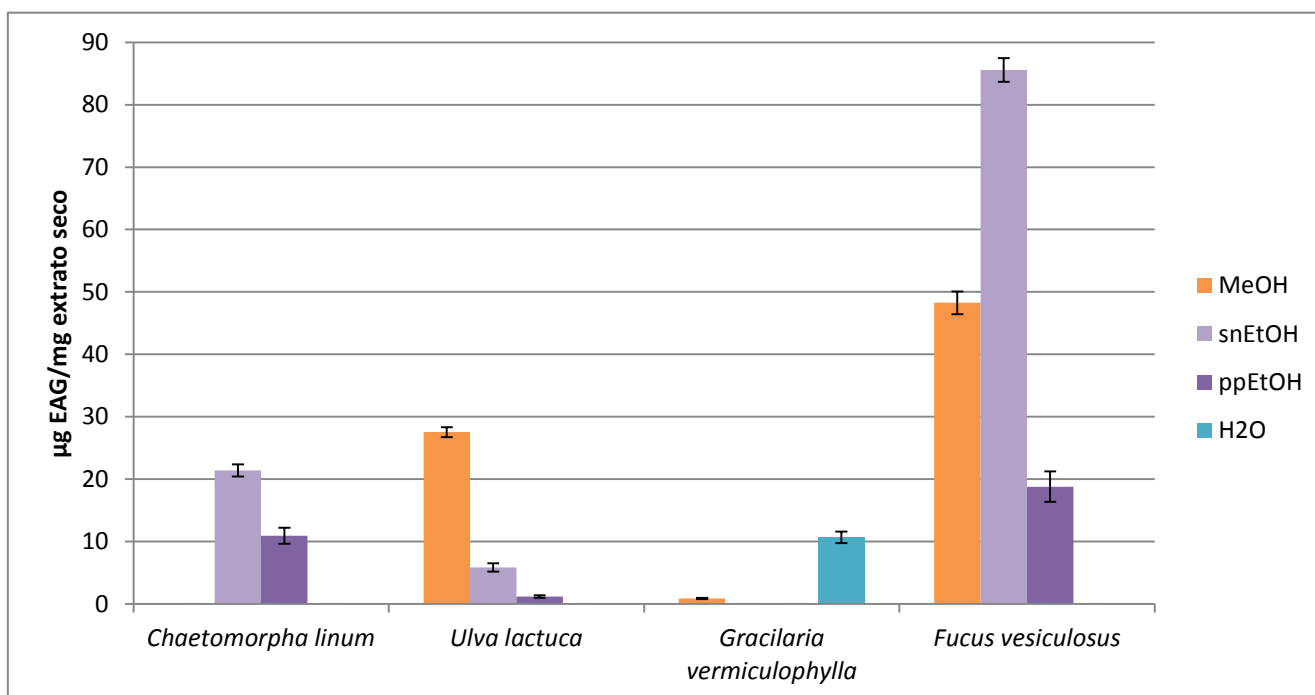


Ilustração 17 - Quantidade total de compostos fenólicos, em µg EAG/mg, nos diferentes extratos. Os valores correspondem à média ± desvio padrão da média (n=3).

De todas as algas em estudo, o extrato com maior quantidade de compostos fenólicos ($85,6 \pm 1,9$ µg/mg extrato seco) foi obtido na alga *Fucus vesiculosus* por extração com água a ferver, seguida de uma purificação com etanol, tendo o material permanecido na mistura etanólica (snEtOH). O valor de compostos fenólicos neste extrato foi aproximadamente 4 vezes superior ao encontrado no extrato equivalente da alga verde *Chaetomorpha linum*. Ainda, comparativamente a valores da literatura, Quirós *et al.* (2008), embora com diferentes espécies de algas castanhas, descreve valores de 1,3 a 10,0 µg/mg extrato húmido. Possivelmente, estes valores elevados devem-se à presença de florotaninas que, como se sabe são compostos fenólicos presentes nas algas castanhas.

Na *Ulva lactuca* o Ext MeOH foi superior em compostos fenólicos ($27,5 \pm 0,8$ µg/mg extrato seco), existindo aqui uma quantidade considerável de fenóis. Num estudo realizado por Raymundo *et al.* (2004), os autores descreveram a quantidade de 6,35 µg/mg para o extrato de MeOH da alga *Ulva fasciata*. El-Baky *et al.* (2008) relata resultados de 4,60 µg/mg para o extrato de MeOH da mesma alga.

Relativamente aos valores da *Gracilaria vermiculophylla*, o extrato H₂O foi o que se destacou ($10,7 \pm 0,9$ µg/mg extrato seco). Estes valores são comparáveis aos obtidos por Mendes (2012) para a mesma alga (12 µg/mg extrato).

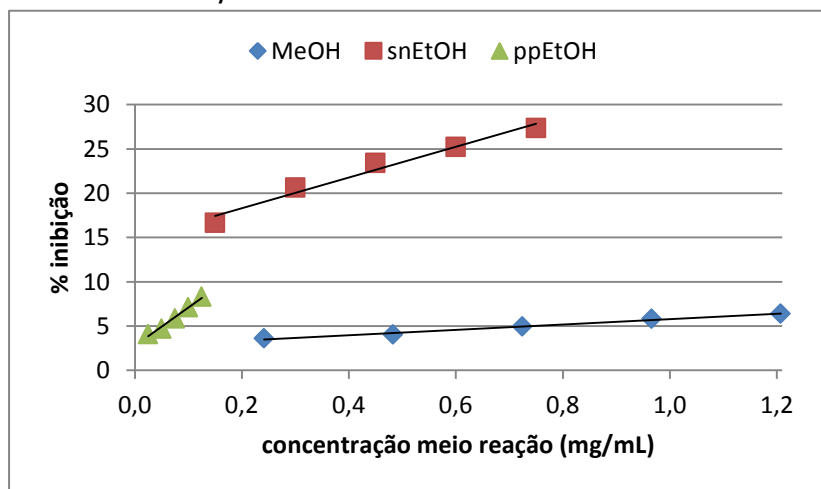
De realçar que para além do evidente destaque do extrato snEtOH na alga castanha, observa-se sempre uma menor quantidade de fenóis no extrato ppEtOH.

De modo a tentarmos compreender as diferenças de valores obtidos com alguns já descritos na bibliografia, poderemos atribuir como já referido, por exemplo, às diferentes condições ambientais de cada local em estudo, às épocas de colheita das amostras, *habitats* e aos extratos obtidos com diferentes solventes (Senthilkumar *et al.*, 2012).

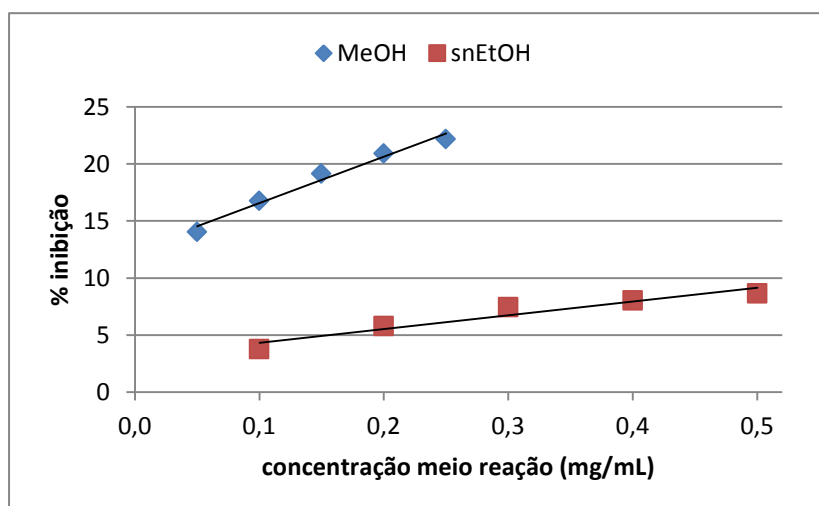
3.5. Avaliação da capacidade antioxidante – Método de captação de radicais livres (DPPH•)

A capacidade dos extratos das algas *Chaetomorpha linum*, *Ulva lactuca*, *Gracilaria vermiculophylla* e *Fucus vesiculosus* em inibir os radicais DPPH• encontra-se representada na seguinte figura.

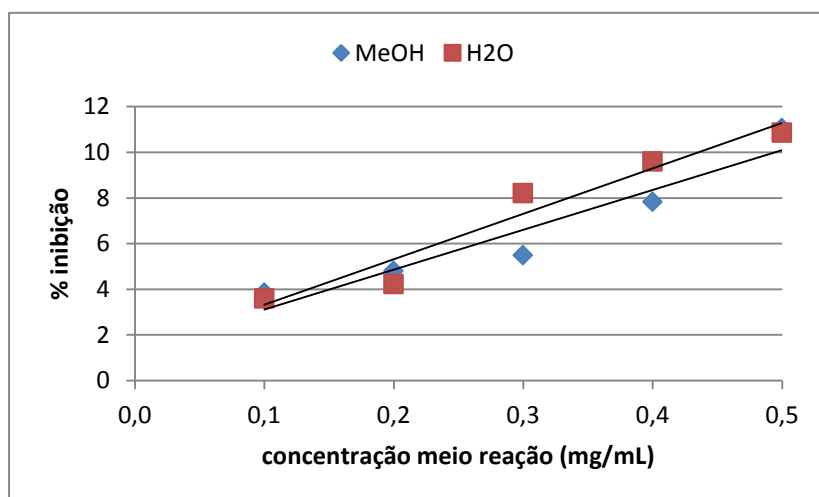
A – *Chaetomorpha linum*



B – *Ulva lactuca*



C – *Gracilaria vermiculophylla*



D – *Fucus vesiculosus*

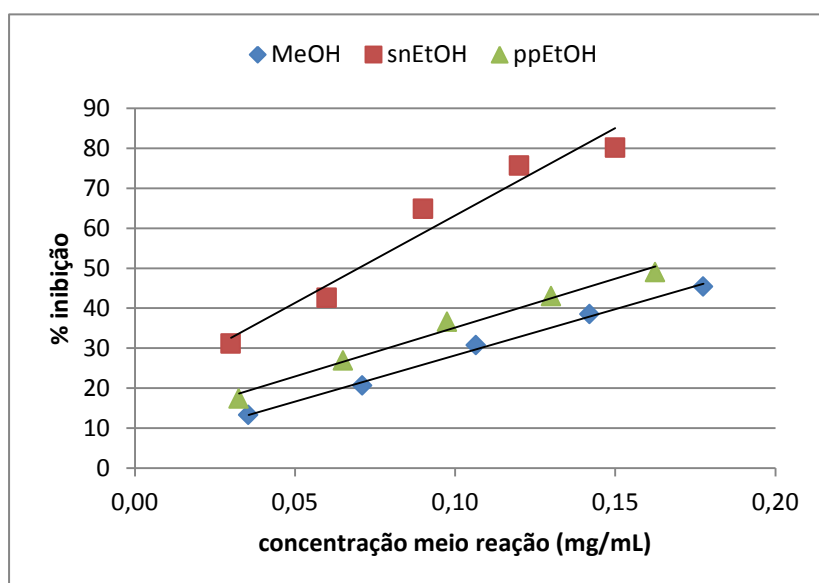


Ilustração 18 – Atividade antioxidante quantificada nos vários extratos pelo método DPPH*, em % de inibição versus concentração do extrato no meio de reação.

De acordo com os resultados apresentados, foi possível concluir que o extrato mais promissor em termos de atividade captadora de radicais DPPH• é o snEtOH da alga *Fucus vesiculosus*. Para este extrato foi obtida uma inibição de 80,1% do radical no meio de reação, com uma concentração de extrato de 0,15 mg/mL. Para esta alga, os extratos ppEtOH e o de MeOH demonstraram ter também alguma capacidade sequestradora do radical DPPH•, com inibições da ordem dos 40-50% para concentrações de 0,15-0,18 mg/mL.

Para além dos extratos acima mencionados, na *Chaetomorpha linum* o extrato snEtOH foi o que mostrou possuir algum potencial antioxidante (28% para uma concentração de 15 mg/mL). Comparando este resultado com um estudo feito por Senthilkumar *et al.* (2012) num extrato metanólico da mesma alga, descrevem-se valores de percentagem nos 6,4% de inibição, embora com concentração de 10 mg/mL.

Na *Ulva lactuca*, o extrato com maior interesse foi o MeOH com 22,7% de capacidade de inibição, para uma concentração de 7,5 mg/mL. Na literatura, um estudo feito por Yan *et al.* (1998), citado por Raymundo *et al.* (2012), os valores obtidos para extratos metanólicos revelaram atividade de apenas 8% para esta alga face ao radical formado.

Ambos os extratos testados da *Gracilaria vermiculophylla* (MeOH e H₂O) demonstraram ter uma capacidade sequestradora baixa. No geral, conseguiu-se obter uma inibição de aproximadamente 10%, para concentração de amostra de 0,5 mg/mL. Assim, analisando valores na literatura, por Zhang *et al.*, nas algas vermelhas *Gracilaria lemaneiformis* e *Gracilaria gracilis*, referem 19,12 e 3,62%, respetivamente, não se distanciando muito dos valores obtidos e com concentrações semelhantes utilizadas em ambos os ensaios (com 4 mg/mL final).

De acordo com o descrito acima, o extrato com menor valor de IC₅₀ foi o snEtOH, sendo este aproximadamente 5 vezes superior ao do ácido ascórbico (um antioxidante muito potente).

Tabela 6 - Tabela resumo com o IC₅₀ para a capacidade de redução do DPPH* dos diferentes extratos na *Fucus vesiculosus* e do ácido ascórbico (média ± desvio-padrão).

	Ext MeOH IC ₅₀ (mg/mL)	Ext snEtOH IC ₅₀ (mg/mL)	Ext ppEtOH IC ₅₀ (mg/mL)	Ácido Ascórbico IC ₅₀ (mg/mL)
<i>Fucus vesiculosus</i>	0,077 ± 0,004	0,026 ± 0,000	0,066 ± 0,000	0,005 ± 0,00

3.6. Avaliação da capacidade antioxidante – Método do Poder Redutor

Este ensaio foi inicialmente testado de forma preliminar para os diferentes extratos de todas as algas, no entanto, como não se obtiveram valores significativos, prosseguiu-se a sua determinação apenas na alga castanha. Tal como foi observado anteriormente, a *Fucus vesiculosus*, já se tinha destacado com valores interessantes na quantificação de compostos fenólicos e na capacidade antioxidante. Assim, o poder redutor dos extratos desta alga foi avaliado e encontra-se representado abaixo.

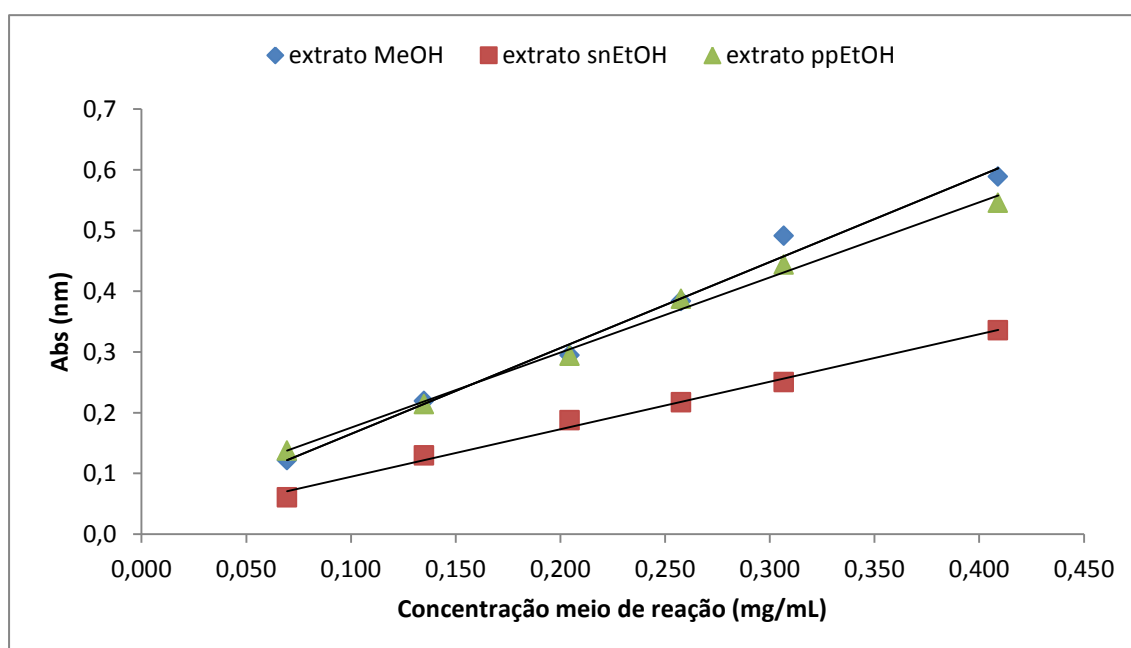


Ilustração 19 - Atividade antioxidante quantificada nos vários extratos, da *Fucus vesiculosus*, pelo método do Poder Redutor, em absorvância (nm) versus concentração meio reação (mg/mL) (n=2).

De acordo com estes dados experimentais, o poder redutor foi mais elevado no extrato snEtOH.

Num estudo de Jónsdóttir *et al.*, também com a *Fucus vesiculosus*, com a concentração de 0,2 mg/mL (extrato etanólico-acetato de etilo), o poder redutor foi descrito com 850 mg/g de extrato. Já de acordo com outro estudo, os valores obtidos na capacidade redutora, utilizando extratos metanólicos, foram de 4,7 mg/g de extrato (Rajauria *et al.*, 2012).

Sendo o poder redutor considerado um indicador significativo do potencial de atividade antioxidante, recentemente foi realizado outro estudo por Seenivasan *et al.* (2013), onde a partir de extratos etanólicos da alga castanha *Sargassum wightii* (concentração de 500 µg/mL) se obtiveram valores de absorvância próximos de 0,5. No presente trabalho, por exemplo, no ppEtOH, uma concentração final de extrato produziu um valor de absorvância de aproximadamente 0,41.

A análise dos resultados obtidos neste trabalho permitiu também proceder à determinação dos valores de IC₅₀ (quantidade de amostra necessária para atingir 0,5 de absorvância) (Tabela 6). Dos resultados apresentados deve salientar-se que todos De notar ainda que todos os valores de IC₅₀ aqui obtidos são 3,5 - 6 vezes superiores ao do BHA, que é conhecido pela sua elevada capacidade antioxidante (antioxidante sintético).

Tabela 7 - Valores do IC₅₀ para a capacidade de redução da forma férrica à forma ferrosa dos diferentes extratos da *Fucus vesiculosus* e do BHA.

Extratos	IC₅₀ (mg/mL)
MeOH	0,353 ± 0,006
snEtOH	0,414 ± 0,045
ppEtOH	0,610 ± 0,087
BHA	0,01 ± 0,005

A relação entre o conteúdo total de polifenóis e a capacidade redutora não foi evidente neste trabalho. No entanto, esta relação positiva entre o

conteúdo total de polifenóis e a capacidade antioxidante foi referida nos trabalhos de Karawita *et al.* (2005), para a alga castanha *Hijiki fusiformes*.

Na literatura também tem sido demonstrado que as algas castanhas produzem compostos com atividade antioxidante, tendo em conta o meio ambiente em que as algas vivem, ou seja, as condições adversas a que estão sujeitas como salinidade, submersão e exposição ao ar constantes, sobre-hidratação, radiação UV, é de esperar esta capacidade antioxidante (Plaza *et al.*, 2008).

Como já referido, a alga castanha foi a que demonstrou maior conteúdo em polifenóis, o que poderá estar relacionado com a presença de florotaninas, uma vez que estas apresentam características polares. Reforçando a ideia de Veijo *et al.*, (2003), que refere que estes são os polifenóis mais conhecidos e muito importantes nas algas castanhas.

4. CONCLUSÃO

As algas marinhas são um recurso renovável com enorme potencial representando uma imensa fonte de compostos naturais muito interessantes para a nutrição humana. Assim, como resultado deste trabalho, que tinha como objetivo avaliar o potencial nutricional e antioxidante das algas escolhidas, foi possível concluir:

- As percentagens do teor de água e cinzas são superiores nas algas verdes e inferiores nas vermelhas, indo ao encontro aos valores descritos em outros estudos; os valores de gordura bruta foram no geral inferiores ao já descrito para as diferentes algas, apresentando-se superiores nas algas castanhas e mínimos nas algas vermelhas; a proteína bruta encontrou-se em maior percentagem na alga vermelha e em menor na castanha e, a fibra bruta, foi no geral em todas as algas deste estudo mais reduzida que o apresentado na literatura.
- A quantidade de metais pesados encontrada em maior quantidade foi de 311,84 mg/kg na alga castanha e 258,85 mg/kg na alga vermelha, para magnésio e ferro, respetivamente. Estes valores encontram-se dentro dos esperados, uma vez que são necessários ao crescimento das algas e estão presentes no ambiente marinho onde se inserem, em quantidades que permitem a absorção por parte da alga.
- Como esperado, os pigmentos com maior expressão nas algas verdes foram as clorofilas α e β , na alga vermelha a ficoeritrina e na castanha o licopeno. No entanto, no geral, os valores obtidos neste trabalho foram mais baixos do que os descritos na literatura.
- A quantidade de compostos fenólicos está relacionada com a atividade anti-radical DPPH[•], mesmo existindo alguns autores que afirmem não existir uma correlação entre os dois. Resultantes dos ensaios efetuados, os extratos que revelaram maior quantidade de compostos fenólicos e capacidade antioxidante foram: na *Chaetomorpha linum* o snEtOH, na *Ulva lactuca* o MeOH, na *Gracilaria vermiculophylla* o H₂O e na *Fucus*

vesiculosus o snEtOH, sendo o ppEtOH e o MeOH igualmente com valores bastante significativos.

Deve ainda salientar-se a importância de, em futuros estudos deste género, a colheita de algas dever ser sujeita a um maior controlo, uma vez que é sabido que as diferentes estações e parâmetros ambientais, tais como intensidade de luz, temperatura, salinidade, disponibilidade de nutrientes e de outros fatores bióticos, influenciam a composição química das algas (Stengel *et al.*, 2011).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andreo D. e Jorge N. – Antioxidantes naturais: Técnicas de Extração. 2006; B.CEPPA, Curitiba v. 24, nº2, p. 319-336, Jul./Dez.

Amado-Filho G., Andrade L., Reis R., Bastos W., Pfeiffer W. - Heavy metal concentrations in seaweed species from the abrolhos reef region, Brazil. Proc 8th Int Coral Reef Sym, v. 2, p. 1843-1846. 1997.

Applegate R. e Gray P. – Nutritional Value of Seaweed to Ruminants. 1995 Rangifer, 15 (1): 15-18

AOAC 1995. Official methods of analysis. 16th ed. Arlington VA, EUA: Association of Official Analytical Chemistry.

Batista C., Barros L., Carvalho A., Ferreira I. - "Nutritional and nutraceutical potential of rape (Brassica napus L. var. napus) and "tranchuda" cabbage (Brassica oleraceae L. var. costata) inflorescences". Food and Chemical Toxicology 49 (2011) 1208–1214

Bajcan D., Harangozo L., Hrabovska D., Boncikova D. – Optimizing conditions for spectrophotometric determination of total polyphenols in wines using Folin-Ciocalteu reagent. 2013. Regular Article, Journal of Microbiology, biotechnology and food sciences. (Special issue 1) 1699-1708.

Basu T., Temple N., Garg M. - Antioxidants in Human Health and Disease. 1999 CABI Publishing.

Besada V., Andrade J., Schultze F., González J. – Heavy metals in edible seaweeds commercialised for human consumption. Journal of Marine Systems 75. 2009. Pags. 305-313.

Biowalk4Biofuel - Algae & Protoplast – Types and Species, Biowalk4Biofuels Project. [SD] Em Linha [Consult. em 20-08-2013] Disponível em WWW: <http://www.biowalk4biofuels.eu/algae-biogas/>

Brendan Gow – Green Algae. SD Em Linha [Consult. em 09-11-2013] Disponível em WWW: <http://academics.smcvt.edu/dfacey/AquaticBiology/Freshwater%20Pages/Green%20Algae.html>

Cabral de Oliveira A., Valentim I., Goulart M., Silva C., Bechara E., Trevisan M. - Fontes vegetais naturais de antioxidantes, 2009; *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 3, 689-702.

Campos, F. P. de; Nussio, C. M. B.; Nussio, L. G. Métodos de análise de alimentos. Piracicaba: FEALQ, 2004. 135p.

Cardoso S., Carvalho L., Silva P., Rodrigues M., Pereira O., Pereira L. – Bioproducts from seaweeds: a review with focus on the Iberian Peninsula.

Carvalho C., Salomão M., Molisani M., Rezende C., Lacerda L. – Contribution of a médium-sized tropical river to the particulate heavy-metal load for the South Atlantic Ocean. 2002 *Sci Tot Environ* 284:85-93.

Chan J., Cheung P., Ang P. - Comparative studies on the effect of three drying methods on the nutritional composition of seaweed *Sargassum hemiphyllum* (Turn) 1997. *C Ag. J Agri Food Chem* 45:3056–3059

Cinnadurai S., Kalyanasundaram G., Chermapandi P., Annadurai H., Perumal A. – Estimation of major pigment contente in seaweeds collected from Pondicherry coast. *The Experiment – International Journal of Science and Tecnology*. 2013 Vol. (9), 522-525

CTA. Dinâmicas Rurais – Sistemas de Informação no mercado – Cultivar o mar. 2005. CTA virtual resource center. Em Linha [Consult. em 25-07-2013] Disponível em WWW:

http://www.anancy.net/index.php?specific=rss&file_id=12234&language=portuguese

Denis C., Morancais M., Li M., Deniaud E., Gaudin P., Wielgosz-Collin G., Barnathan G., Jaouen P., Fleurence J. – Study of the chemical composition of edible red macroalgae *Grateloupia turuturu* from Brittany (France). Food Chemistry 119 (2010) 913-917.

El-Baky H., El Baz F., Baroty G. – Evaluation of Marine Alga *Ulva lactuca* L. as a source of natural preservative ingredient. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 3(3): 434-444, 2008.

Erika Mattos Stein – Avaliação das atividades biológicas e composio química dos extratos de algas vermelhas do gnero *Laurencia* (Rhodomelaceae, Ceramiales) do litoral do Espírito Santo, Brasil. Dissertao de Mestrado – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botnica 2011. Em Linha [Consult. em 25-09-2013] Disponível em WWW: http://www.google.pt/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=web&cd=1&ved=0CC0QFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.teses.usp.br%2Fteses%2Fdisponiveis%2F41%2F41132%2Ftde-21092011-155134%2Fpublico%2FErika_Stein.pdf&ei=IVd1Uu-BAaeg7AaQ8YFI&usg=AFQjCNFP6m7rR952qUkQN08dukERLYemCQ&sig2=12mLgfgeXxWlpwporT-OBw

FAO Corporate Document Repository. - Training manual on *Gracilaria* culture and seaweed processing in China. Chapter III - Carrageenan – A red seaweed polysaccharide. – Application of carrageenans – In food, 1990. Em Linha [Consult em 20-08-2013] Disponível em WWW: <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB730E/AB730E03.htm>

Fernando R. F. Silva - Estudo comparativo de carragenanas comerciais Kappa, Iota e Lambda no processo inflamatório em ratos: edema intraplantar e pleurisia. 19-Jul-2005. Em Linha [Consult. em 20-11-2013] Disponível em WWW: <http://repositorio.ufrn.br:8080/jspui/handle/1/7761>

Ferraces-Casais P., Lage-Yusty M., Quirós A., López-Hernández J. – Evaluation of Bioactive compounds in fresh edible seaweeds. Food Anal. Methods 2012 5:828-834.

Fleurence, J. - Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. 1999. Trends Food Sci Technol 10:25–28

Garcia E., Barrett D. – Assessing Lycopene content in California processing tomatoes. Journal of Food Processing and Preservation 30 (2006) 56-70.

Guiry M. e Guiry G. – AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Em Linha [Consult. em 10-10-2013] Disponível em WWW: http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=4417

Holdt S. & Kraan S. – Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. Fevereiro 2011. Journal of Applied Phycology 23, Pags. 543-597.

Hwang E., Amano H., Park C. – Assessment of the nutritional value of *Capsosiphon fulvescens* (Chlorophyta): developing a new species of marine macroalgae for cultivation in Korea. J Appl Phycology 2008 20:147-151.

Jeon You-Jin & Lee Seung-Hong - Anti-diabetic effects of brown algae derived phlorotannins, marine polyphenols through diverse mechanisms. Fitoterapia. Volume 86; Abril 2013. Pags. 129-136

Jormalainen V., Honkanen T., Koivikko R., Eranen J. – Induction of phlorotannin production in a brown alga: defense or resource dynamics?, 2003; Oikos, 103: 640-650.

Jónsdóttir R., Hamaguchi P., Geirsdóttir M., Kristinsson H. – Bioactive compounds from Icelandic marine source. Matís ohf. Icelandic Food and Biotech R&D – Vínlandsleio 12, 113 Reykjavík. Em Linha [Consult. em 23-09-2013] Disponível em WWW: http://www.matis.is/media/einblodungar/Poster-bioactive-compounds_web.pdf

Kim Nag-Jong, Li H., Jung K., Chang H., Lee P. – Ethanol production from marine algal hydrolysates using *Escherichia coli* KO11. Bioresource Technology 102. 2011. Pags. 7466-7469.

Kiran C., Madhavi Y., Rao T. – Evaluation of Phytochemicals and Antioxidant Activities of Ceiba pentandra (Kapok) Seed Oil. Bioanalysis & Biomedicine. 2012 Volume 4(4): 068-073. doi:10.4172/1948-593X.1000065

Kumar N., Kumar R., Bora A., Amb M., Chakraborty S. – An Evaluation of the Pigment Composition of Eighteen Marine Macroalgae collected from Okha Coast, Gulf of Kutch, India. Our Nature (2009) 7:48-55

Kursar T., Van der Meer J., Alberte R.- Light-Harvesting System of the Red Alga Gracilaria tikvahiae. I Biochemical analyses of pigment mutations. Plant Physiol 1983. 73. Pags.353-360

Lein de Leon. Agar ou agar-agar: O mais antigo Ficocolóide. Aditivos & Ingredientes. Pag 31. Em Linha [Consult. em 20-08-2013] Disponível em WWW: http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/87.pdf

Leonel Pereira – As Algas marinhas e respectivas utilidades. 2008 Monografias 913: 1-19 Em Linha [Consult. em 20-10-2013] Disponível em WWW: <http://br.monografias.com/trabalhos913/algas-marinhas-utilidades/algas-marinhas-utilidades.pdf>

Leonel Pereira. Guia Ilustrado das Macroalgas - Composição Pigmentar e Classificação. 2009 Em Linha [Consult. em 25-08-2013] Disponível em WWW: http://books.google.pt/books?id=k-IMxD9pn7UC&pg=PT14&lpg=PT14&dq=composi%C3%A7%C3%A3o+pigmentar+%2B+ALGAS&source=bl&ots=gHQXjmwM9e&sig=DDHow8PgVkYYqqqUW6dqSgEXxGU&hl=pt-PT&sa=X&ei=J_NmUvTHGqrH7AapuYDQCg&ved=0CDUQ6AEwAQ#v=onepage&q=composi%C3%A7%C3%A3o%20pigmentar%20%2B%20ALGAS&f=false

Leonel Pereira. Littoral of Viana do Castelo - ALGAE: Uses in agriculture, gastronomy and food industry (Bilingual), Câmara Municipal de Viana do Castelo: Viana do Castelo, 2010.

Leonel Pereira. A Review of the Nutrient Composition of selected Edible Seaweeds, Chapter 2, 2011. Nova Science Publishers, Inc. Institute of Marine Research, Department of Life Sciences. ISBN 978-1-61470-878-0

MacArtain P., Gil C., Brooks M., Campbell R., Rowland I. – Nutritional value of edible seaweeds. 2007 Nutrition Reviews, Vol. 65, No. 12 535-543.

Machado A., Ferreira A., Zalmon I. – Metais Pesados em Macroalgas marinhas na costa norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil. 2003 Tropical Oceanography, Recife: v.31, n. 1, p. 71-80.

Madden M., Mitra M., Ruby D. – Seasonality of selected nutritional constituents of edible Delmarva seaweeds. Journal of Phycology 48. 2012 Pags. 1289-1298

Malinowski L., Rosa E., Picheth C., Campelo P. – Atividade antimicrobiana dos extratos aquoso e hidroalcóolico de folhas de *Artemisia vulgaris*. 2007 Revista Brasileira de Farmacologia. Pags. 63-66.

Marinho-Soriano E., Fonseca P., Carneiro M. A. A., Moreira W. S. C. - Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. 2006 Bioresour Technol 97. Pags. 2402–2406

Martini L., Mattos D., Barbosa D., Rech A. - Uso de sensoriamento remoto orbital para avaliação da distribuição espacial de Clorofila_a na Lagoa da Conceição - Florianópolis, SC – Artigo Técnico, 30-07-2006; Em Linha [Consult. em 03-02-2013] Disponível em WWW: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-41522006000400004&script=sci_arttext

Matsukawa, R., Dubinsky, Z., Kishimoto, E., Masaki, K., Masuda, Y., Takeuchi, T., Chihara, M., Yamamoto, Y., Niki, E. and Karube, I. 1997. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. *Journal of Applied Phycology*. 9. Pags.29-35.

Marta Sofia de Almeida Mendes – Functional activity of seaweed extracts from the north portuguese coast – 3.4 Determination of total antioxidant activity. Setembro 2012 Em Linha [Consult. em 13-09-2013] Disponível em WWW:http://repositorio.ucp.pt/bitstream/10400.14/11368/1/Tese_Marta%20Mendes.pdf

Martins S., Mussatto S., Martínez-Avila G., Montañez-Saenz J., Aguilar C., Teixeira J. - Bioactive Phenolic Compounds: Production and Extraction by Solid-State Fermentation - A Review. 2011; *Biotechnology advances*. Vol. 29, Pags. 365–373.

Meenakshi S., Gnanambigai D., Mozhi S., Arumugam M., Balasubramanian T. – Total flavanoid and in vitro Antioxidant Activity of two seaweeds of Rameshwaran coast. 2009 *Global Journal of Pharmacology*, 3(2): 59-62 ISSN 1992-0075

McHugh, D. J. (2003) *A Guide to the Seaweed Industry*. FAO Fisheries Technical Paper 441, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. [<http://www.fao.org/docrep/006/y4765e/y4765e00.htm#Contents>]

Mikami K. e Hosokawa M. – Biosynthetic pathway and health benefits of Fucoxanthin, an algae-specific xanthophyll in brown seaweeds. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013, 14, 13763-13781.

Miyashita K. - The Carotenoid Fucoxanthin from Brown Seaweed Affects Obesity. 2009; *Lipid Technology* 21(8-9): 186–90.

Molyneux, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity Songklanakarin J. Sci. Technol., 2004, 26(2): 211-219

Mota da Silva V., Silva L., B. de Andrade J., Veloso M., Santos G. – Determination of moisture content and water activity in algae and fish by thermoanalytical techniques. 2008; Quim. Nova, Vol. 31, No. 4, 901-905.

Patarra, A. R.F. - Pesquisa de Ácidos Gordos em Macroalgas Marinhas do litoral dos Açores. 2008 Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Mar - Recursos Marinhos, especialidade em Biologia Marinha. Porto.

Patarra R., Paiva L., Neto A., Lima E., Baptista J. – Nutritional value of selected macroalgae. Journal Appl. Phycol. (2011) 23:205–208.

Pitaro S., Fiorani L., Jorge N. – Potencial antioxidante dos extratos de manjerição (*Ocimum basilicum* Lamiaceae) e orégano (*Origanum vulgare* Lamiaceae) em óleo de soja. 2012. Revista Brasileira de Plantas Medicinaiis vol.14 no.4.

Polat S. e Ozogul Y. - Biochemical composition of some red and brown macroalgae from the Northeastern Mediterranean Sea. 2008 Int J Food Sci Nutr 59:566–572

PZNOW - Shorelife - Seaweed – Green seaweeds [SD] Em Linha [Consult. em 16-08-2013] Disponível em WWW: <http://www.pznow.co.uk/marine/greenseaweed.html>

Quirós A., Frecha-Ferreiro S., Vidal-Pérez A., López-Hernández J.- (2010) "Antioxidant compounds in edible brown seaweeds". Eur Food Res Technol (2010) 231:495–498.

Rajauria G., Jaiswal A., Abu-Gannam N., Gupta S. – Antimicrobial, Antioxidant and Free Radical-Scavenging capacity of Brown seaweed *Himanthalia elongata* from western coast of Ireland. 2012. Journal of Food Biochemistry ISSN 1745-4514.

Rabinowitch E. e Govindjee – Photosynthesis. Chapter 9: The Photosynthetic Pigments. 1969 John Wiley & Sons, Inc. Pag.109-115 Em Linha [Consult. em 08-11-2013] Disponível em WWW: <http://www.life.illinois.edu/govindjee/photosynBook/Chapter9.pdf>

Rank J. - Algae _ Algae and their characteristics, types of algae, ecological relationships, factors limiting the productivity of algae - Species, Brown, Green, and Pigments – Em Linha [Consult. Em 11-11-2013] Disponível em WWW: <http://science.jrank.org/pages/205/Algae.html#ixzz2kRVw16O1>

Raymundo M., Horta P., Fett R. – Atividade antioxidante in vitro de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil). Ver. Bras. Cienc. Farm. Vol. 40, n. 4, out./dez., 2004.

Robert Edward Lee. Phycology. Fourth edition. Part V-21 p.426-475. Colorado State University USA. Cambridge University Press. ISBN-13 978-0-511-38669-5

Ruben Cassel Rodrigues – Métodos de Análises Bromatológicas de Alimentos: Métodos Físicos, Químicos e Bromatológicos. Documentos 306 Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Clima Temperado. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Dezembro 2010. Em Linha. [Consult. em 27-08-2013] Disponível em WWW: http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/download/documentos/documento_306.pdf

Rupérez P. – Mineral content of edible marine seaweeds. Food Chemistry 79. 2002 Pags. 23-26.

Rupérez P. e Saura-Calixto F. - Dietary fibre and physicochemical properties of edible Spanish seaweeds. 2001 Eur Food Res Technol 212:349–354

Salman A., Ferreira A., Soares J., Souza J. - Metodologias para avaliação de alimentos para ruminantes domésticos. Documentos 136, Maio 2010. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agroflorestal

de Rondônia; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em WWW: http://www.cpafrro.embrapa.br/media/arquivos/publicacoes/doc136_alimentacao_ruminantes.pdf

Sathya R., Kanaga N., Sankar P., Jeeva S. - Antioxidant properties of phlorotannins from brown seaweed *Cystoseira trinodis* (Forsskål) C. Agardh – Arabian Journal of Chemistry. Outubro 2013; <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.09.039>

Schmidt É., Pereira B., Santos R., Gouveia C., Costa G., Faria G., Scherner F., Horta P., Martins R., Latini A., Ramlov F., Maraschin M., Bouzon Z.- "Responses of the macroalgae *Hypnea musciformis* after in vitro exposure to UV-B" Aquatic Botany 100 (2012) 8 – 17

Schultz-Jensen N., Thygesen A., Leipold F., Thomsen S., Roslander C., Lilholt H., Bjerre A. - Pretreatment of the macroalgae *Chaetomorpha linum* for the production of bioethanol – Comparison of five pretreatment technologies. Bioresource Technology 140 (2013) 36-42 Em Linha [Consult. em 30-09-2013] Disponível em WWW: http://studentsrepo.um.edu.my/2448/10/CHAPTER_4_RESULTS.pdf

Seenivasan R., Indu H. – In vitro antioxidante activity of selected seaweeds from southeast coast of India. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. ISSN-0975-1491 Vol 5, Suppl 2, 2013.

Seidel, V. - Initial and Bulk Extraction. In: Natural Products Isolation. 2006. (Eds. S.D. Sarker, Z. Latif and A.I. Gray), 2nd edition. Humana Press, New Jersey. pp. 27-47.

Senthilkumar P. e Sudha S. – Antioxidant and Antibacterial properties of methanolic extract of green seaweed *Chaetomorpha linum* from Gulf of Mannar: Southeast coast of India. Jundishapur Journal of Microbiology 2012; 5(2): 411-415.

Sivakumar S. e Arunkumar K. – Sodium, Potassium and Sulphate composition in some seaweeds occurring along the coast of Gulf of Mannar, India. 2009 Asian Journal of Plant Sciences 8 (7): 500-504 ISN 1682-3974.

Sousa M., Pires K., Alencar D., Sampaio A., Saker-Sampaio S. – α - and β -carotene, and α -tocopherol in fresh seaweeds. Ciência Tecnologia Alimentar, Campinas, 28(4): 953-958, out.-dez. 2008

Souza B., Cerqueira M., Bourbon A., Pinheiro A., Martins J., Teixeira J., Coimbra M., Vicente A. – Chemical characterization and antioxidante activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. Food Hydrocolloids 27 (2012) 287-292.

Stengel, D., Connan, S., Popper, Z. - Algal chemodiversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for commercial application. 2011. Biotechnonology Advances. 29(5): 483-501.

Storelli M., Storelli A., Marcotrigiano G. - Heavy Metals in the aquatic environmental of the Southern Adriatic Sea, Italy Macroalgae, Sediments and Benthic Species. Environ. Intern. v. 26, p. 505-509. 2001.

Sze, P., 1998. A Biology of the Algae. McGraw-Hill Companies. 3rd Edition. Boston. United States of America

Targett N. & Arnold T. – MiniReview: Predicting the effects of brown algal phlorotannins on marine herbivores in tropical and temperate oceans. Journal of Phycology, Vol34. Setembro 2002. Pags.195-205

Thomas Friedl – The evolution of the Green Algae. Plant Systematics and Evolution. Springer-Verlag 1997, Pags. 87-101.

Uchida M. e Miyoshi T. – Review: Algal fermentation - The Seed for a New Fermentation Industry of Foods and Related Products. 2013 JARQ 47(1), 53-63.

Van den Hoek C., Mann D., Jahns H. - Algae: An introduction to phycology. Cambridge University Press. 1995. 623p.

Vazhiyil Venugopal - "Marine Polysaccharides: Food Applications", Chapter 4 "Polysaccharides from Seaweed and Microalgae", 2011,. ISBN: 978-1-4398-1527-4

Yusty M.-A., Caramés-Adán P., López-Hernández J.- "Determination of phycobiliproteins by constantwavelength synchronous spectrofluorimetry method in red algae". CyTA 2013 - Journal of Food.

Wijesinghe W.A.J.P. & Jeon Y-J. - Enzyme-assistant extraction (EAE) of bioactive componentes: A useful approach for recovery of industrially importante metabolites from seaweeds: a review. Fitoterapia 83 (2012) 6-12.

Wong, K. and Cheung, P.C. - Nutritional evaluation of some subtropical red and green seaweeds. 2002. Part 1-proximate composition, amino acid profiles and some physico-chemical properties. Food Chemistry. 7, Pags. 475–482.

Zenebron, O.; Pascuet, N. S.; Tiglea, P. (Coord.). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4. ed.; versão digital. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2008. 1020 p. Disponível em WWW: http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=0&func=stardown&id=1

Zhang W., Duan X., Huang H., Zhang Y., Wang B. – Evaluation of 28 marine algae from the Qingdao coast for antioxidative capacity and determination of antioxidant efficiency and total phenolic content of fractions and subfractions derived from *Symphycladia latiuscula* (Rhodomelaceae). Em Linha [Consult. em 18-09-2013] Disponível em WWW: <http://www.aseanbiodiversity.info/Abstract/51007834.pdf>